



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A01H 5/00, C12N 15/29</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/22242</p> <p>(43) 国際公開日 1997年6月26日 (26.06.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03653</p> <p>(22) 国際出願日 1996年12月13日 (13.12.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/347823 1995年12月15日 (15.12.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社(KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 柿谷 誠(KAKITANI, Makoto)[JP/JP] 梅基直行(UMEMOTO, Naoyuki)[JP/JP] 石田 功(ISHIDA, Isao)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP) 山岡直人(YAMAOKA, Naoto)[JP/JP] 〒062 北海道札幌市豊平区美園8-8-1-1 Hokkaido, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MOLD-RESISTANT PLANT AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 カビ耐性植物及びその作出方法</p> <p>(57) Abstract A process for producing a plant resistant to pathogenic molds by integrating a DNA sequence coding for glucan elicitor receptors into plant chromosomes to effect expression; a plant resistant to pathogenic molds, which contains the DNA sequence coding for glucan elicitor receptors introduced thereinto and expressed therein; and the use thereof.</p>		

(57) 要約

グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を植物染色体中に組込んで
発現させることにより、病原性のカビに対して抵抗性を持つ植物を作出する方法；
グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が導入されており、かつ、
発現している、病原性のカビに対して抵抗性を持つ植物；および、それらの使用。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア共和国
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SS	スーダン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	ST	セント・ヘレナ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	VI	ヴィエトナム	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	IE	アイルランド	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CC	カカ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	MW	モザンビーク	US	米国
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン共和国
CH	スイス	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CI	コート・ジボワール	KR	韓国	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	PR	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド		
CO	コロンビア	RU	ロシア	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン				
DK	デンマーク	LU	ルクセンブルグ				

明 細 書

カビ耐性植物及びその作出方法

技術分野

本発明は、カビ耐性植物及びその作出方法に関し、さらに詳細には、グルカン エリシターレセプターをコードするDNA配列が導入されたカビ耐性植物及びその作出方法に関する。

背景技術

植物は、病原菌に感染すると、ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性物質を新たに合成してこれを蓄積するという抵抗性反応を示すことが知られている [M. Yoshikawa (1978) Nature 257: 546]。このような植物の抵抗性反応を誘導する物質が植物疫病菌から見いだされ [N. T. Keen (1975) Science 187: 74]、これらの物質はエリシターと総称されている。植物の病原菌による感染から、ファイトアレキシン合成および蓄積までの生化学的過程は以下のように考えられている。まず、病原菌の菌糸が植物組織に侵入すると、宿主中に存在するグルカナーゼが働いて病原菌の細胞壁表面の多糖を切断してエリシターを遊離させる。このエリシターが植物細胞に存在するレセプターと結合すると、シグナル伝達の役目をするセカンドメッセンジャーが生成され、このシグナル伝達物質が植物細胞の核内に入ってファイトアレキシン合成系酵素をコードする遺伝子転写を活性化し、ファイトアレキシン合成系酵素を誘導する。それと同時にファイトアレキシン分解系が抑制され、効率よくファイトアレキシンが蓄積する。

ダイズの場合、ダイズの抵抗性に大切な役割をしめすファイトアレキシンはグリセリオリンと呼ばれ、その構造も決定されている [M. Yoshikawa et al. (1978) Physiol. Plant. Pathol. 12: 73]。また、エリシターは種々の長さの β -1, 6 結合のグルカン为主鎖とし、その主鎖から β -1, 3 結合したグルカンの側鎖が分枝した特徴のある構造を持つものである [J. K. Sharp et al. (1984) J. Biol. Chem. 259: 11321, M. Yoshikawa (1990) 植物細胞工学 1.2: 695]。ダイズの病原糸状菌の一種である疫病菌 (Phytophthora megasperma f. sp. gl

ycinea) 由来のグルカンエリシターに対する特異的なレセプターは抗菌性物質であるグリセオリンの合成、蓄積に重要な役割を果たしているタンパク質であると考えられるが、このエリシターに特異的なグルカンエリシターレセプターに関しては、その精製法 [E. G. Cosio et al. (1990) FEBS 264: 235, E. G. Cosio et al. (1992) Eur. J. Biochem. 204: 1115, T. Frey et al. (1993) Phytochemistry 32: 543] 及び部分アミノ酸配列 [柿谷ら、特開平6-321995] が報告されているが、グルカンエリシターレセプターをコードする遺伝子については全く知られていない。グルカンエリシターレセプターをコードする遺伝子が見出されれば、これを植物染色体中に組込んで発現させることにより、病原性のカビに対して抵抗性を持つ植物を作出することができ、農作物の生産性を向上させることができるものと期待される。

従って、本発明は、グルカンエリシターレセプターをコードする遺伝子が導入された植物を提供することを目的とする。

また、本発明は、グルカンエリシターレセプターをコードする遺伝子が導入された植物の作出方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意努力した結果、ダイズcDNAライブラリーからグルカンエリシターレセプター遺伝子をクローニングし、これをタバコ植物体へ導入して発現させることに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を植物染色体中に組込んで発現させることにより、病原性のカビに対して抵抗性を持つ植物を作出する方法を提供する。また、本発明は、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が導入されており、かつ、発現している、病原性のカビに対して抵抗性を持つ植物を提供する。

図面の簡単な説明

第1図は、各カラム処理を行った画分のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンの写真である。

第2図は、プラスミドpER23-1 およびpER23-2 の構成を示す。

第3図は、プラスミドpKV1-ER23の構築の概略図である。

第4図は、ダイズ培養細胞にエリシターを添加すると細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇することを示す。

第5図は、形質転換タバコ培養細胞にエリシターを添加すると細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇することを示す。

第6図は、大腸菌で発現した、グルカンエリシターレセプターの全長及び部分長のエリシター結合活性を示す。

第7図は、エリシター結合ドメインの抗体によってエリシターとダイズ子葉膜画分中のエリシター結合タンパクとの結合が阻害されることを示す。

第8図は、エリシター結合ドメインの抗体によってエリシターが誘導するダイズ子葉のファイトアレキシン蓄積反応が阻害されることを示す。

第9図は、形質転換タバコがタバコ疫病菌に対して抵抗性を有することを示す。

第10図は、形質転換タバコがタバコ腰折病菌に対して抵抗性を有することを示す生物の形態の写真である。

第11図は、形質転換タバコがタバコ腰折病菌に対して抵抗性を有することを示す。

第12図は、タバコ疫病菌の遊走子接種試験で形質転換タバコがタバコ疫病菌に対して抵抗性を有することを示す。

第13図は、プラスミドpPG1の構造を示す。

第14図は、グルタチオンSトランスフェラーゼ・インゲングルカナーゼ融合蛋白質のグルカナーゼ活性の測定結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

グルカンエリシターレセプターは、ファイトアレキシンの生産に関与し、カビの細胞壁成分であるグルカンに由来するグルカンエリシターのレセプターとして機能するタンパク質である。その機能は、例えば、植物疫病菌であるPhytophthora属の微生物が植物組織に侵入した際に、疫病菌の細胞壁の一部が宿主の β -1,3-グルカナーゼによって切り出されて作られるグルカンエリシターとの結合に

より、植物細胞内のファイトアレキシン含量を増大させることをミクロソーム及び核に指示するというものである。本発明者らは、グルカンエリシターレセプターの具体例として、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプターを見出している（特願平6-136100）。「実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列」とは、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列に加えて、グルカンエリシターレセプターの機能を有している限りにおいて、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列に幾つかのアミノ酸の欠失、置換、付加などがあってもよいことを意味するものである。このようなグルカンエリシターレセプターは、例えば、Cosioら [E. J. B. (1992) 204: 1115] の方法を一部変更した方法により得られる。即ち、ダイズ、好ましくは、品種グリーンホーマーの根、葉、莖等をホモゲナイズし、得られたスラリーから膜画分を回収し、これをイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、更にエリシターをリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーにより精製することにより得られる。この際用いるエリシターとしては、グリーンホーマーに対して不親和性（病原菌に対して耐性）を示すという点から、*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* レース1 (ATCC34566) 由来のものが好ましい。

上記のようにして得られたグルカンエリシターレセプターのアミノ酸配列は以下のようにして決定することができる。まず、精製したグルカンエリシターレセプターをPVDF膜（ミリポア社製）にエレクトロブロットィングにより転写し、これをリジルエンドペプチダーゼ（AP-1）にて消化する。断片化されたペプチドをPVDF膜上から回収し、これらを逆相HPLC（ μ -Bondasphere 5 μ C8）にて分画した後、それぞれのピーク画分について、気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社製）で分析する。

グルカンエリシターレセプターは、カビに対する耐病性の機構解明やカビ耐性を誘導するエリシターの誘導体の開発に、また、グルカンエリシターレセプターに対する抗体を調製するための抗原として有用である。

本発明に用いるグルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列は、3'側末端に接して少なくとも1個の停止コドン（例えばTAG）を持つことが好ましい。

具体的には、実質的に配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有するグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含む DNA を用いることができる。なお、「グルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含む DNA」とは、縮重異性体をすべて含むものである。ここで、「縮重異性体」とは、縮重コドンにおいてのみ異なっていて、同一のポリペプチドをコードすることのできる DNA を意味する。たとえば配列番号 2 の塩基配列を有する DNA に対して、そのアミノ酸のどれかに対応するコドン例えば Asn に対応するコドン (AAC) が、これと縮重関係にあるコドン例えば AAT に変わったものを縮重異性体と呼ぶこととする。このような縮重異性体の一例としては、配列表の配列番号 2 に示す塩基配列を含む DNA を挙げることができる。また、プラスミド pER23-1 に組み込まれ、グルカンエリシターレセプターをコードしている塩基配列を含む DNA 配列を用いてもよい。プラスミド pER23-1 を導入した大腸菌 DH5 α EKB633 は、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成 6 年 6 月 15 日付けで寄託され、その微生物受託番号は FERM BP-4699 である。(日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号)

本発明に用いるグルカンエリシターレセプターをコードする DNA 配列は、所望により、5' 一側上流に翻訳フレームと合わせて翻訳開始のメチオニンをコードする ATG 配列、その 5' 一側上流および 3' 一側下流に非翻訳領域として適当な長さの他の DNA が結合してもよい。

本発明に用いるグルカンエリシターレセプターをコードする DNA 配列の代表的存在形態は、プラスミドまたはファージ DNA の中に構成員の一部としてこの DNA 配列が挿入された形態、並びに、プラスミドまたはファージあるいはゲノム DNA の中にこの DNA 配列が挿入された形で微生物（特に細菌）またはファージ粒子あるいは植物の中に存在する形態である。ここでいう細菌としては、大腸菌やアグロバクテリウムを挙げることができる。

グルカンエリシターレセプターをコードする DNA 配列が植物中で安定に発現するように、この DNA 配列に、プロモーター、翻訳開始コドンをコードする DNA (ATG) およびターミネーターを、適宜組み合わせ付加してもよい。上記のプロモーターとしては、リブ羅斯-1, 5-2 リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター (Fluhr ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (19

86) 83:2358)、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター(Langridgeら、Plant Cell Rep. (1985) 4:355)、カリフラワーモザイクウィルス19S-RNAを生じるプロモーター(Guilleyら、Cell (1982) 30:763)、カリフラワーモザイクウィルス35S-RNAを生じるプロモーター(Odellら、Nature (1985) 313:810)などを用いることができる。ターミネーターとしては、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター(Depickerら、J. Mol. Appl. Gen. (1982) 1:561)、オクトピン合成酵素遺伝子のターミネーター(Gielenら、EMBO J. (1984) 3:835)などを用いることができる。

上記のようなグルカンエリシターレセプターをコードするDNAを取得する方法の一つの方法としては、核酸合成の方法に従ってそのDNAの少なくとも一部を化学合成し、これをプローブとして使用して、適当なcDNAライブラリーから、慣用されている方法、例えば、免疫学的方法あるいはハイブリダイゼーション法により取得する方法を挙げることができる。上記の方法に用いる幾つかのプラスミド類、様々な制限酵素やT4 DNAリガーゼ、その他の酵素類としては市販のものを使用してよい。また、DNAのクローニング、各プラスミドの構築、宿主のトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのDNA等の回収は文献記載の方法 [Molecular Cloning, J. Sambrook et al., CSH Laboratory (1989), Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., John Wiley & Sons(1987)他]に準じて行なうことができる。

具体的には、以下のようにして、グルカンエリシターレセプターをコードするDNAを取得することができる。まず、グルカンエリシターレセプター中の2種類のアミノ酸部分配列を選択し、これらのアミノ酸配列のC末端側をコードすると考えられるあらゆる塩基の組み合わせのプライマーと前記アミノ酸配列のN末端側をコードすると考えられるあらゆる塩基の組み合わせのプライマーとを作成し、これらをミックスプライマーとして用い、適当なサイズcDNAライブラリーのDNAを鋳型としてPCR反応を行う。その後、PCR反応生成物の中から、増幅が予想される特定の長さの2つの増幅断片(前記の2種類のアミノ酸部分配列をコードするDNAに相当する)を取り出し、これらの塩基配列を決定する。決定された塩基配列を基に、上記の2つのアミノ酸部分配列のうち、グルカンエ

リシターレセプター中でC末端側に位置するアミノ酸部分配列のC末端側をコードする塩基配列を有するプライマーと、グルカンエリシターレセプター中でN末端側に位置するアミノ酸部分配列のN末端側をコードする塩基配列を有するプライマーとを合成する。これらの2種のプライマーを用いて、前記のダイズcDNAライブラリーのDNAを鋳型としてPCR反応を行う。得られた増幅断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、前記のダイズcDNAライブラリーからグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAを取得する。

上記のようにして得られるグルカンエリシターレセプターをコードする塩基配列を含むDNAの塩基配列の決定は、公知の方法を用いて行うことができる。例えば、マキサム-ギルバート法 (Maxam-Gilbert, Methods Enzymol., 65:499, 1980) やM13 フェージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (J. Messing, et al., Gene, 19:269, 1982)等により行うことができる。

グルカンエリシターに関する種々の研究から、グルカンエリシターレセプターが植物におけるカビ耐性に重要な役割を担っていることが示唆されているから、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を公知の方法に従ってグルカンエリシターレセプターを持たない植物細胞、特に高等植物細胞に導入して発現させれば、カビ耐性を植物に付与することができるものと思われる。また、一般に植物に感染可能なカビはサプレッサーをもち、従来、植物自身がもつカビに対する抵抗性を抑制する能力を獲得しているという説が提唱されている。しかし、これらの場合でも、グルカンエリシターレセプターが機能するようにグルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を導入し発現させることや、これらのDNAに改変を加えたり、その発現量を調節することにより、カビにより耐性効果のある植物を新たに育種できる可能性を開くことが期待される。

さらに、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を、カビ抵抗性を示すグルカナーゼなどカビに対する抵抗性を高める遺伝子や形質と共に植物やその細胞、特に高等植物やその細胞に導入し発現させれば、グルカナーゼ等を導入した場合よりもさらに強いカビ抵抗性を植物に付与することができるものと思われる。グルカナーゼをコードするDNA配列としては、実質的に配列表の配列番

号3及び34に示したアミノ酸配列を有するグルカナーゼをコードする塩基配列を含むDNAを挙げることができる。なお、「グルカナーゼをコードする塩基配列を含むDNA」とは、縮重異性体をすべて含むものである。このような縮重異性体の一例としては、配列表の配列番号4及び33に示す塩基配列を含むDNAを挙げることができる。

グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を植物細胞に導入するためのベクターは、グルカンエリシターレセプターが植物体中で安定に発現しうるように構成されればよい。具体的には、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列に、プロモーター、翻訳開始コドンにコードするDNA(ATG)およびターミネーターなどが適宜組み合わせられて付加されてもよい。上記のプロモーターとしては、リブロース-1,5-2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター(Fluhrら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:2358)、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター(Langridgeら、Plant Cell Rep. (1985) 4:355)、カリフラワーモザイクウィルス19S-RNAを生じるプロモーター(Guilleyら、Cell (1982) 30:763)、カリフラワーモザイクウィルス35S-RNAを生じるプロモーター(Odellら、Nature (1985) 313:810)などを用いることができる。ターミネーターとしては、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター(Depickerら、J. Mol. Appl. Gen. (1982) 1:561)、オクトピン合成酵素遺伝子のターミネーター(Gielenら、EMBO J. (1984) 3:835)などを用いることができる。

植物細胞及び植物体への遺伝子導入方法としては、通常公知の方法、例えば「*Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual*」, J. Draper, et al. eds., Blackwell Scientific Publications, 1988」記載の方法を用いて行うことができる。その例としては、生物的方法であるウィルスを用いる方法、アグロバクテリウムを用いる方法など、物理・化学的方法であるエレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、マイクロインジェクション法、パーティクル・ガン法、デキストラン法などが挙げられる。一般に、DNAを導入しようとする植物が双子葉植物である場合には、アグロバクテリウムを用いる方法が好ましいことが多い。単子葉植物やアグロバクテリウムに感染しにくい双子葉植物の場合には、エレクトロポレーションなどの物理・化学的方法が好ましい。

DNA導入のための植物材料としては、導入法などに応じて、葉、茎、根、塊茎、プロトプラスト、カルス、花粉、種子胚、苗条原基などから適当なものを選択することができる。

また一般に、植物培養細胞へDNAを導入する場合、材料としてプロトプラストが用いられ、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法などの物理・化学的方法によってDNAの導入が行われるのに対して、植物組織へDNAを導入する場合、材料としては葉、茎、根、塊茎、カルス、花粉、種子胚、苗条原基など、好ましくは葉、茎が用いられ、ウイルスやアグロバクテリウムを用いた生物学的方法やパーティクルガン法、マイクロインジェクション法などの物理・化学的方法、好ましくはアグロバクテリウムを用いた生物学的方法によってDNAの導入が行われる。

さらに、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が導入された植物組織や植物細胞から植物を再分化させるには、このような形質転換植物や植物細胞をタバコ由来のものであればホルモンフリーのMS培地等の培地で培養すればよい。発根した幼植物体は、土壌に移植して栽培することにより植物体とすることができる。

上記のような方法でグルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を導入し、発現させることにより、病原性のカビに対する抵抗性を付与したり、病原性のカビに対する抵抗性を増強することができる植物としては、細胞壁にグルカンを含む病原性のカビが感染する植物が挙げられる。具体的には、ナス科植物、マメ科植物等を例示でき、さらに具体的には、タバコ、ダイズ、ジャガイモ、イネ、キク、カーネーションなどを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

また、病原性のカビとしては、細胞壁成分にグルカンを含むものが対象となり、具体的には、*Phthophthora*属、*Rhizoctonia*属、*Pyricularia*属、*Puccinia*属、*Fusarium*属、*Uromyces*属、*Botrytis*属などを挙げることができ、さらに具体的には、*Phthophthora nicotianae*、*Rhizoctonia solani*、*Pyricularia oryzae*、*Puccinia horiana*、*Fusarium oxysporum*、*Uromyces dianthi*、*Botrytis cinerea*などを挙げるができるが、これらに限定されることはない。

本発明により、植物に導入されたグルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列は、植物体から植物体へ種子を媒介として後代へと遺伝されうる。このため、本発明の植物体の花粉あるいは子房から形成される種子においても導入したDNA配列が存在し、遺伝形質が子孫への受け継がれうる。従って、本発明のグルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を導入された植物は、種子による増殖によって、病原性のカビに対する抵抗性が失われることなく、増殖が可能である。また、植物組織培養法を用いた大量増殖法や従来から行われている挿木、取木、接木、株分けなどによっても、病原性のカビに対する抵抗性が失われることなく、増殖が可能である。

形質転換植物がカビに対して抵抗性を有しているか否かについては、以下のような試験方法により検討することができる。

疫病菌であれば、植物個体に直接菌糸体を接種し病斑の増大による検出が出来る。また、疫病菌の遊走子を接種し病斑の形成およびその拡大で抵抗性を検定出来る。

土壌菌では、培養した菌体を土壌にすき込み、その土壌に播種もしくは植物体を植え、立ち枯れの現象を観察することによって抵抗性を検定出来る。

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって限定されるものではない。以下の実施例においては、グルカンエリシターレセプターを「ER」と略して記載することとする。

〔実施例1〕 ダイズ根由来のグルカンエリシターレセプターの精製

1) ERの結合活性測定法

エリシター（平均分子量 10,000）とチラミン（東京化成工業社製）の複合体をJong-Joo Cheong [The Plant Cell (1991) 3: 127] らの方法に従い合成した。次に、エリシターとチラミンの複合体をクロラミンTを用いてヨードラベルした。

アッセイ用緩衝液500 μ l (50mM Tris-HCl pH7.4、0.1M Saccharose、5mMMgCl₂、1mM PMSF、5mM EDTA) 中にサンプル（タンパク量500 μ g以下）を懸濁し、0℃で2時間インキュベートした後、7.0nM ヨードラベル化エリシターチラミン複合体（70Ci/mmol、モル数の計算はエリシターの分子量を10,000と仮定して行った、

以下同様)を加え、4℃で2時間インキュベートした。ワットマンGF/B(0.3%ポリエチレンイミン水溶液で1時間以上処理した)で反応溶液を濾過した後、5mlの氷冷緩衝液(10mM Tris-HCl pH7.0, 1M NaCl, 10mM MgCl₂)で3回洗浄し、膜上に残った放射活性をガンマカウンターでカウントした(カウントA)。非特異的結合による影響を除くため、同じサンプルに17μMのエリシターを加えアッセイ用緩衝液に懸濁した後、0℃で2時間インキュベートし、上記と同様の操作を行ない、得られたカウントを上記のカウントAから差し引きすることにより、ERの特異的結合によるカウント(Δcpm)を求めた。得られたカウント数(Δcpm)と、実験に用いた全カウント数の商を求め、次いで実験に用いた全エリシター量との積を求めることでエリシター結合蛋白量(mol数)を計算した。

ERの精製は、本測定法を用いて行った。

2) ダイズ根由来のERの精製

ダイズ(グリーンホーマー)種子(タカヤマシード社製)を1週間バーミキュライトで栽培した後、15日間水耕栽培を行ない、根を湿重約40Kg収穫した。収穫した根は精製に使用するまで-80℃で凍結保存した。湿重2Kgの根に対して1.25Lの氷冷懸濁緩衝液(25mM Tris-HCl pH7.0, 30mM MgCl₂, 2mM Dithiothreitol, 2.5mM メタ重亜硫酸ナトリウム, 1mM PMSF)を加え、ワーリングブレンダーで2分間ホモゲナイズした。

得られたスラリーをミラクロス(カルビオケム社製)で濾過し、濾液を9,000rpm、4℃で15分間遠心した。上清を37,000rpm、4℃で、20分間超遠心し、沈殿を氷冷緩衝液160ml(25mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1M シュークロース, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA)に懸濁して膜画分を得た。ERを膜画分より可溶化するため、終濃度0.25%となるよう両イオン性界面活性剤ZW3-12(ベーリンガー社製)を加え、8℃で30分間攪拌した。可溶化されたERを回収するため、37,000rpm、4℃で20分間超遠心を行ない、上清を回収した(可溶性画分)。可溶性画分165mlを緩衝液(50mM, Tris-HCl pH 8.0, 0.2%ZW3-12, 4℃)2Lで4回透析した後、サンプル中よりプロテアーゼを除きERを安定化するため、プロトラップ(宝酒造社製)5mlを加え、8℃で、30分間ゆっくり攪拌した。その後、遠心(2,800rpm, 4℃, 2分間)し、上清を回収した。得られた上清160mlを、限外濾過膜YM-10(アミコ

ン社製)を用いて、約50mlに濃縮した後、A緩衝液(50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1Mシュクロース, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA, 0.2%ZW3-12, 4℃)に透析した。

次いで、Q-セファロースHP 26/10(ファルマシア社製)にアプライし、0から1M NaClのリニアグラジエントを行なってERを溶出した(Q-Sepharose 活性画分)。ERはNaCl濃度0.45M付近に溶出された。Q-Sepharose 活性画分をA緩衝液で3倍に希釈した後、MonoQ10/10(ファルマシア社製)にアプライし、0から1M NaClのリニアグラジエントを行なってER画分8mlを溶出した(MonoQ 活性画分)。ERはNaCl濃度0.25M付近に溶出された。

最後に、エリシターをリガンドとしたアフィニティーゲルによりERを精製すべく以下の操作を行なった。まず、エリシターはN. T. Keen [Plant Physiol. (1983) 71: 460, Plant Physiol. (1983) 71: 466]らの方法を一部変更し、以下のようにして調製した。疫病菌(*Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*)レース1(ATCC34566)の細胞壁をザイモリアーゼ100T(キリンビール社製)で処理しエリシターを遊離させた後、CM-セルロースにザイモリアーゼ100Tを吸着させ、得られた素通り画分をゲル濾過G-75(ファルマシア社製)にて精製して平均分子量1万の画分を回収した。回収画分のグリセオリンを誘導するエリシター活性をM. Yoshikawa [Nature (1978) 257:546]の方法にしたがって測定したところ、8 μ gのエリシターをダイズの子葉に与えると、24時間後に約550 μ gのグリセオリンが誘導された。

ゲル担体に対する非特異的吸着を除くため、MonoQ 活性画分を集め、約33mgのマルトース結合ガラスゲル(ベッド体積約100 μ l)と8℃で1時間攪拌し、ゲルを遠心(1,000 rpm, 4℃, 2分間)で沈殿させ、上清を回収した(マルトース結合ガラスゲル素通り画分)。なお、マルトース結合ガラスゲルは、A. M. Jeffrey et al. [Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975) 62: 608]らの方法に従って以下のようにして作製した。マルトース120mgとGlass, Aminopropyl(シグマ社製)6gを36mlのH₂Oに懸濁し、室温で一晩攪拌した。これにエタノール36mlを加え、その直後、72mlのエタノールに864mgの硼水素化ナトリウムを溶解したものを加え、2分間ソニケートし、5時間室温で攪拌した。288mlのH₂Oを加えて氷

冷し、酢酸でpH5.6に調製した。結合しなかったマルトースを除くため、ゲルを約1.8lのH₂Oで洗浄した。洗浄液中に含まれるマルトースをアンスロン試薬を用い、J. H. Roe[J. Biol. Chem. (1955) 212: 335]の方法に従って定量し、洗浄液中に含まれるマルトースの量から、ゲルに結合したマルトース量を推定した。その結果、6gのGlass Aminopropylに対して60mgのマルトースが結合したことがわかった。

マルトース結合ガラスゲル素通り画分8mlに、約17mgのエリシター結合ガラスゲル（ベッド体積約50 μ l）を加え、8℃で一晩ゆっくり攪拌した。遠心（1,000 rpm, 4℃, 2分間）で、ゲルを回収し、2ベッド体積のA緩衝液で2回洗浄した。4ベッド体積の0.1%SDSで3回洗浄し、ゲルに結合したERを回収した（エリシター結合ガラスゲル溶出画分）。なお、エリシター結合ガラスゲルは、A. M. Jeffrey et al. [Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975) 62: 608]らの方法に従って以下のようにして作製した。エリシター37mgとGlass Aminopropyl 490mgを6mlのH₂Oに懸濁し、室温で一晩攪拌した。これにエタノールを6ml加え、その直後、12mlのエタノールに144mgの硼水素化ナトリウムを溶解したものを加え、2分間ソニケートし、5時間室温で攪拌した。48mlのH₂Oを加え、氷冷し、酢酸でpH5.6に調製した。結合しなかったエリシターをアンスロン試薬を用いて定量し、洗浄液中に含まれるエリシターの量から、ゲルに結合したエリシター量を推定した。その結果、490mgのGlass Aminopropylに対して、34mgのエリシターが結合したことがわかった。以上の各精製ステップにおけるタンパク質量及びER量を第1表に示す。

第1表. 各精製ステップにおけるタンパク質量及びER量
(ダイズ根、湿重約40kgを出発材料とした)

	タンパク質 (mg)	ER量 (pmol)
膜画分	17900	30
可溶化画分	2000	214
Q-Sepharose 活性画分	190	205
MonoQ 活性画分	49	233
マルトース結合ガラスゲル素通り画分	45	220
エリシター結合ガラスゲル溶出画分	0.004*	45

* SDS-PAGEを銀染色したとき得られたバンドの濃さで推定した。

上記のMonoQ活性画分、マルトース結合ガラスゲル素通り画分およびエリシター結合ガラスゲル溶出画分（各10 μ l）を電気泳動用グラジエントゲル、SDS-PAGEプレート10/20（第一化学薬品社製）を用いて電気泳動し、銀染色（第一化学薬品社製）により染色した。これらの電気泳動のパターンを第1図に示す。第1図中のレーン1はMonoQ活性画分、レーン2はマルトース結合ガラスゲル素通り画分、レーン3はエリシター結合ガラスゲル溶出画分を示す。第1図が示すように、ERのバンドは、分子量約70,000付近に検出された。

分子量約70,000に検出されたタンパク質がエリシター結合活性を持つことは、フォトアフィニティー試薬、SASD（ピアス社製）とエリシターの複合体をヨードラベル化したものを用いて、分子量約70,000のタンパク質がヨードラベル化されたこと、および、膜画分のSDS-PAGEをPVDF膜へウエスタンブロッティングし、PVDF膜をERの結合能活性測定に用いたのと同じヨードラベル化エリシターとインキュベートしたところ、分子量約70,000のタンパク質がヨードラベル化されたことより示された。

上述の方法により、湿重約40kgの根から約4 μ gのERが精製された。

3) ERの断片化ペプチドの分析

ERをプロテアーゼ消化によってペプチド断片化して、岩松の方法〔岩松明彦、生化学、(1991) 63:139、A. Iwamatsu, Electrophoresis (1992) 13: 142〕によって断片化ペプチドのアミノ酸配列を決定した。上述の方法で精製したERの溶液をセントリコン-30（アミコン社製）で約100 μ lに濃縮し、10-20%ポリアクリルアミドSDS電気泳動を行なった後、各バンドをPVDF膜（ミリポア社製）へエレクトロブロットング装置（Sartrius社製）により転写した。転写されたPVDF膜を0.1%Ponceau S（シグマ社製）/1%酢酸で染色し、分子量約70,000のメインバンドを切り取り、0.5mM NaOHで脱色した。これを還元S-カルボキシメチル化し、リジルエンドペプチダーゼ（AP-1）を酵素：基質（mol:mol）比で1：100になるよう加え、30℃で16時間反応させた。生成した断片化ペプチドを溶媒A 98%と溶媒B 2%で平衡化した μ -Bondasphere 5 μ C8-300 Å（2.1x150mm, Waters）カラムにアプライし、溶媒Bに関し2-50%のリニアグラジェントで30分間、流速0.25 ml/分で溶出した（溶媒A：0.05%TFA 水溶液、溶媒B：2-プロパノール：アセトニトリル＝7：3（v/v）中の0.02%TFA）。溶出されたペプチドを214nmにおける吸収で検出し、それぞれのピーク画分をマニュアルで集めた。得られたそれぞれのピーク画分は、気相プロテインシーケンサー（Applied Biosystems Model 470A）を用いて分析した。すべての得られたピーク画分を分析した結果、以下の断片化ペプチドアミノ酸配列が明確に決定された。

#1:Val Asn Ile Gln Thr Asn Thr Ser Asn Ile Ser Pro Gln（N-末端）（配列番号5）

#5:Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val Gly Asp Ser（配列番号6）

#6:Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp（配列番号7）

#7:Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile Lys（ミックス配列）（配列番号8）

〔実施例2〕 ダイズERのクローニング

1) ダイズmRNAの取得

ダイズ（グリーンホーマー）種子（タカヤマシード社製）を1週間バーミキュライトで栽培した後、15日間水耕栽培を行ない、根を湿重約40Kg収穫した。その

一部を液体窒素により凍結し使用するまで -80°C で保存した。石田（細胞工学実験操作入門 講談社サイエンティフィック）らの方法に従い全RNAの取得を行なった。凍結保存した根（湿重28.5g）に液体窒素を加えながら乳鉢で粉末状にした。この粉末に、 65°C に保温したGTC溶液35.6mlを加えワーリングブレンダーで攪拌し、得られた懸濁液を6,000rpm、15分間、室温で遠心し上清40mlを回収した。セシウムクッション液をあらかじめ入れた遠心管に得られた上清を静かに重層し、35,000rpm、20時間、 25°C で遠心した。得られた沈殿に9mlのTE/0.2%SDSを加えて溶解した。2回フェノール/クロロホルム抽出を行なった後、エタノール沈殿で4.37mgの全RNAを回収した。

上記で得られた全RNA2.2mgをオリゴデックス-dT30（日本ロッシュ社製）を用いてマニュアルに従い精製し、68 μg のpoly(A)+RNAを精製した。

2) ダイズcDNAライブラリーの作成

5 μg のpoly(A)+RNAをcDNA合成キット（ファルマシア社製）を用いて、マニュアルに従い、cDNAを合成した。合成したcDNA断片はラムダファージベクター $\lambda\text{gt}10$ （ストラタジーン社製）にT4リガーゼ（宝酒造社製）を用いて連結した。さらにDNA混合溶液を用いて、ファージ粒子にギガパック（ストラタジーン社製）を用いてパッケージングし、約150万pfuのダイズのcDNAライブラリーを作成した。このライブラリーを増幅して 1.6×10^{11} pfu/ml、160mlのダイズcDNAライブラリーを得た。

cDNAライブラリーの全DNAは以下の様に調整した。500 μl のファージ液（ 1.6×10^{11} pfu/ml）を等量のクロロホルム/イソアミルアルコール（24:1）を加えて30秒間振とうした後、遠心分離により水層を回収した。クロロホルム/イソアミルアルコール（24:1）により再抽出した後、水層に5 μl の3M酢酸ナトリウムpH5.4溶液と125 μl のエタノールを加えて遠心し、沈殿を回収した。この沈殿を70%エタノール溶液で洗浄後、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA（シグマ社製）を含む10mMトリス塩酸pH8溶液に溶解し、これをPCR法の鋳型として使用した。

3) ダイズERのcDNA断片のPCR法による増幅とクローニング

実施例1で得られた断片化ペプチドのアミノ酸配列（#5と#6）を基にミックスプライマーとして、

プライマーU5 5'-AARAGYATHGAYGGNGA-3' (配列番号9)

プライマーU7 5'-WRTCNCNACNAC-3' (配列番号10)

プライマーU10 5'-GTNAAYAARATNCARAC-3' (配列番号11)

プライマーU12 5'-ARRTTNAGRAARTCYTC-3' (配列番号12)

(R : A / G、Y : C / T、W : A / T、H : A / C / T、N : A / G / T / C) の4種類のオリゴデオキシヌクレオチド(プライマーU5 ; プライマーU7 ; プライマーU10 ; プライマーU12)を自動核酸合成機(アプライドバイオシステム社モデル394)を用いて合成した。

0.5 μ gのcDNAライブラリー中の全DNAを79 μ lの蒸留水に溶解し、10 μ lの10xPCRバッファー(宝酒造社製Taq DNAポリメラーゼに添付)、8 μ lの2.5mM dNTPにプライマーU5とU7もしくはU10とU12をそれぞれ100 pmolずつ及び0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を加え最終量100 μ lとし、以下のようにPCR反応を行なった。反応装置はパーキンエルマー社製ジーンアンプPCRシステム9600を用いた。反応は、1)変性94℃ ; 30秒、2)再生47℃ ; 30秒、3)伸長72℃ ; 1分の操作を50回繰り返して行った。反応後、反応液の15 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。電気泳動に供した上記ゲルを0.5 μ g/mlの臭化エチジウム溶液で10分間染色し、UV下で観察して、それぞれ増幅が予想される40 bpと47 bpの特異的増幅断片を示すバンドを切り出した。同ゲル断片をプラスチック棒で粉碎後、溶出バッファー(0.5M酢酸アンモニウム、10mM酢酸マグネシウム、1mM EDTA、0.1% SDS)で1晩溶出し、DNAを含む溶液を回収した。

回収したDNA断片をプラスミドpT7Blue(R)にpT7Blue T-Vector Kit(ノバゲン社製)を用いてクローニングし、得られたプラスミドp#5-1, 2, p#6-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9を蛍光プライマー・サイクル・シーケンス・キット(アプライドバイオシステム社製)と蛍光自動DNAシーケンサー(アプライドバイオシステム社モデル373A)を用いてDNAの配列を決定した。その結果、得られた増幅DNA断片のプライマー以外の部分は、#5および6の断片化ペプチドのアミノ酸配列をコードしていた。

上記DNA配列決定の結果を基にして、ミックスプライマーとして

プライマーU18 5'-AAGTAYAAGCCRCAAGCCTATTCA-3' (配列番号13)

プライマーU19 5'-ATCGCCRACAACMCCAA-3' (配列番号14)

(YおよびRは上記のとおり、M: A/C)

とする2種類のオリゴデオキシヌクレオチド(プライマーU18; プライマーU19)を自動核酸合成機を用いて合成した。

0.5 μ gのcDNAライブラリーの全DNAを79 μ lの蒸留水に溶解し、10 μ lの10x PCRバッファー、8 μ lの2.5mM dNTPにプライマーU18とU19をそれぞれ100 pmolずつ及び0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼを加え最終量100 μ lとし、PCR反応を行なった。反応は、1) 変性94℃; 30秒、2) 再生52℃; 30秒、3) 伸長72℃; 1分の操作を40回繰り返して行った。反応液の15 μ lを1%アガロースゲル電気泳動にかけた。

電気泳動に供した上記ゲルを0.5 μ g/mlの臭化エチジウム溶液で15分間染色し、UV下で観察して、特異的に増幅が観察できた約540bpの増幅断片のバンドを切り出した。同ゲル断片はジーンクリーンII(バイオ101社製)によって処理し、DNAを含む溶液を回収した。

回収したDNA断片をプラスミドpT7Blue(R)にpT7Blue T-Vector Kitを用いてクローニングし、得られたプラスミドp#5-#6のDNAの配列を蛍光シーケンサーにて決定した。得られた増幅DNA断片は、539bpからなり、#5および6の断片化ペプチドのアミノ酸配列をコードしており、増幅した部分には#7の断片化ペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列が存在することがわかった。

4) ハイブリダイゼーションによるライブラリーのスクリーニングとクローニング

ERのcDNA断片がクローニングされているプラスミドp#5-#6の、制限酵素BamHIおよびPstIによって切り出されるDNA断片(約540bp)を回収し、プローブとして用いた。回収されたDNA断片をメガプライムDNA標識システム(アマシャム社製)を用い、マニュアルに従って[α -³²P]dCTPにてラベル化し、反応液をハイブリダイゼーションの実験に供した。

ファージライブラリーを大腸菌C600 hfl (インビトロジェン社製)に感染させ、10 mg/mlのMgCl₂を含むL培地を入れた直径約15 cmのシャーレにまいて

総数約100万個のプラークを形成させた後、ナイロンメンブレン (Hybond-N ; アマシャム社製) にブロッティングした。 ^{32}P -dCTPで標識したエリクター受容体 cDNA断片をこのメンブレンと反応させ、オートラジオグラフィーによって検出した陽性ファージを再度同様にスクリーニングすることにより、シグナル強度の異なる約30個のファージクローンを得た。この中から挿入DNA断片の最も長いクローン λ ER23を選択した。

ハイブリダイゼーション実験より単離したポジティブなクローン λ ER23のファージ液からラムダソープ (プロメガ社製) を用いて λ ファージDNAを精製した。5 μg のDNAに10 μl の10 x EcoRI切断バッファー制限酵素EcoRI 10 Uを加え、全量を100 μl とし37°Cで一晩反応させた。反応液を1%アガロースゲル電気泳動で分離し、約2.3 kbのバンドを切り出し、ジーンクリーンII (バイオ101社製) によって処理し、DNAを含む溶液を回収した。一方、0.02 μg のベクターpBluescriptII KS- (ストラタジーン社製) を制限酵素EcoRIで切断した。

両DNA溶液を混合し、2 μl の10 x リガーゼバッファーと0.2 μl のT4 DNAリガーゼ (宝酒造製) を加え、全量20 μl として16°Cで4時間反応させ、この反応混合溶液を用いて大腸菌DH5 α (ギブコBRL社製) を形質転換した。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IPTG、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-galを含むL培地25 mlで2%寒天平板培地を作成した。同培地に形質転換した大腸菌をまき、37°C 1晩生育させた。生育した菌のうち、白色のコロニーを示す菌を選び、3 mlの50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL培地で37°Cで8時間培養した。これらの菌からアルカリ法にてプラスミドを回収し、制限酵素にて正しい断片がクローニングされたクローンであるかどうかを調べ、ベクターに対する方向を異にするプラスミドpER23-1とpER23-2(5225bp)を得た。プラスミドpER23-1およびpER23-2の構成を第2図に示す。

5) ERをコードするクローンのDNA塩基配列の決定

ERのcDNAがクローニングされているプラスミドpER23-1とpER23-2を適当な制限酵素を用いるか、塩基配列の決定した部分から適当なプライマーを合成し用いるか、前者プラスミドは制限酵素KpnIとXhoIで、後者プラスミドは制限酵素Kp

nlとClaIで切断後、キロシーケンス用ディリジョンキット（宝酒造製）を用いて、ほぼ200-300bpごとに欠失したプラスミドを作成するかを行ない、これらを用いて蛍光シーケンサーで両方向のDNA塩基配列を決定した。そのDNA塩基配列を配列表の配列番号2に示す。その結果、そのDNA断片中にはアミノ酸シーケンサーで決定されたN-末端からの配列（#1の断片化ペプチド）に対応する塩基配列を先頭に2001bpからなるORFが存在し、667残基のアミノ酸がコードされていると推定された。このアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。得られたDNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列は先に決定したダイズERのアミノ酸配列と一致した。

さらに、核酸およびアミノ酸配列の解析ソフト（マックベクター：コダック社製）と核酸およびアミノ酸配列のデータベース（Entrez：NCBI）を用いて相同性の高いアミノ酸配列の検索を行なったところ、現在まで知られている配列と強い相同性を示すものは確認できなかった。従って、前記のERは全く今まで知られていなかった新規のタンパク質であることが明らかとなった。

〔実施例3〕 ダイズERのタバコ培養細胞での発現

1) 植物培養細胞発現プラスミドpKV1-ER23の構築

まず、第3図に示すように、カリフラワー・モザイクウィルスの35Sプロモーターを含むプラスミドpCaP35J [J. Yamaya et al. (1988) Mol. Gen. Genet. 211: 520]を基にして、本実施例で用いる植物培養細胞発現ベクターpKV1を以下のように作製した。まず、pCaP35Jの35Sプロモーターの上流域にある多クローニング部位を欠失する目的で制限酵素BamHIで完全消化した後、PvuIIで部分消化後、クレノウ断片（宝酒造社製）処理を施し平滑化した後、ライゲーション反応を行ない環状化した。これを大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドを得た。さらに35Sプロモーターの下流域に多クローニング部位を挿入する目的で制限酵素PstIで消化後、クレノウ断片処理を施し平滑化した。さらにHindIIIで消化して、自動核酸合成機を用いて合成した下記に示す合成リンカー用DNAをアニーリングした後、ライゲーションで組み込み、大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドpCaP35Y（2837bp）を得た。

5' -GGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA-3' (配列番号 15)

5' -CCTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCCA-3' (配列番号 16)

上記のpCaP35Yにノパリン合成酵素のターミネーターを導入する目的で、pBI121 (クローンテック社製) の断片 (SacI-EcoRI断片を分離しクレノウ断片で平滑化したもの) をプラスミドpCaP35Yの35Sプロモーターの下流のHindIII部位をやはり平滑化したものとライゲーションで組み込み、大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドを得た。このプラスミドにカナマイシン耐性カセットを導入する目的で、このプラスミドをPvuIIで消化して、pLGVneo1103 [R. Hain et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 161] の断片 (オクトピン合成酵素ターミネーター下流に存在するPvuII部位で切断後、Bal31 (宝酒造製) 処理を施し、欠失を生じさせた。さらにノパリン合成酵素プロモーターの上流はEcoRI部位で切断後、両端を平滑化したもので約1620bpになる断片) をライゲーション反応で連結し、これを大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドである植物発現用ベクターpKV1 (4828bp) を得た。作成したpKV1を単一制限酵素であるBamHIとSalIで消化し、ER遺伝子を含む断片 (pEB23-1のBamHI-SalI断片、約2.3kbp) をライゲーションで組み込み、これを大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のER発現用プラスミドpKV1-ER23 (約7.1kbp) を得た。

2) ERのタバコ培養細胞での一過的発現

電気穿孔法によるERのタバコ培養細胞での一過的発現は渡辺らの方法[Y. Watanabe (1987) FEBS 219: 65]を一部改変して行なった。上記で作成したプラスミドpKV1-ER23のDNAはアルカリ法によって精製した。一過的発現のためのタバコ培養細胞の取得は平井らの植物細胞育種入門 (学会出版センター1982) に従って行った。タバコ (品種ブライトイエロー: 東京大学内宮博文教授より分与) の種子を1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で滅菌したのち発芽させ、発芽直後のタバコ幼組織をタバコ培養用寒天培地 (ムラシゲとスクーグ培地: フローララボラトリー社製に2ppm 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、3%蔗糖と0.8%寒天) に植え込み、3

週間でカルスを誘導した。約 1 g のカルス塊を 50ml のタバコ培養用培地（ムラシゲとスクーグ培地：フローララボラトリー社製に 2ppm 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、3%蔗糖）に懸濁し培養細胞を作製した。これらのタバコ培養細胞を植え継ぎで対数増殖期にした後、遠心分離器（600rpm, 3分間）で回収し、1%セルラーゼ・オノヅカ（ヤクルト社製）、1%ドリセラゼ（協和発酵社製）、0.1%ペクトリアーゼ（盛進製薬社製）、0.4M D-マンニトール（和光純薬社製）HClで pH 5.7に調製したものに懸濁し、30℃ 90分間反応しプロトプラストを作成した。遠心を3回繰り返すことにより、4℃の0.4M D-マンニトールで洗い酵素液を取り除いた。電気穿孔法の一回の操作は 1×10^6 の細胞を 0.8 ml の電気穿孔用溶液（70 mM KCl, 5 mM MES, 0.3 M マンニトール）に懸濁し、10 μ g の pKV1-ER23 の DNA と混ぜ、電気穿孔用キュベット（バイオラッド社製、電極間 0.4 cm）に入れ、ジーンパルサー（バイオラッド社製）を用い、125 μ F、300V で処理を行なった。処理後、パスツールピペットで回収した溶液を氷上で 30分放置した後 30℃で 5分反応させ、遠心分離によりプロトプラスト培地（ムラシゲとスクーグ培地：フローララボラトリー社製に 0.2 ppm 2,4-D、1%蔗糖、0.4M マンニトールを添加し pH 5.7に調製）に再懸濁した。細胞をその後、暗所 25℃で一晩静置培養した後、遠心（8,000rpm, 3分間）で回収し、60 μ l の懸濁緩衝液（25mM Tris-HCl pH 7.0, 30mM MgCl₂, 2mM Dithiothreitol, 2.5mM メタ重亜硫酸ナトリウム, 1mM PMSF）を加え 3分間ボルテックスで攪拌した。得られた標品はエリクター結合実験を行なうまで -80℃で保存した。

対照として、pKV1-ER23のDNAの代わりにpKV1のDNAをタバコ細胞に導入した他は上記の操作を繰り返した。

3) ERのタバコ培養細胞での定常的発現

定常的にER遺伝子を保持する形質転換タバコ培養細胞は以下のようにして一過的発現のタバコ培養細胞から選別した。

前述した一過的発現のタバコ培養細胞の作成で得られたプロトプラストを1%アガロースを含んだプロトプラスト培地（ムラシゲとスクーグ培地：フローララボラトリー社製に 0.2 ppm 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、1%蔗糖、0.4M マンニトールを添加し pH 5.7に調製）に懸濁し、アガロースが固化する前にシャーレにス

ポイトで懸濁液を滴下して、プロトプラストをビーズ状の固形培地に固定した。アガロースが固まった後、シャーレにアガロースを含まないプロトプラスト培地を加えプロトプラストを固定したアガロース培地を液体培地で浸した。暗所で一週間培養した後に終濃度100ppmのカナマイシンを加え、更に培養を継続し、増殖してきたコロニーを選別して得られた形質転換体をカナマイシンを含む液体培地に移し培養した。定常的にpKV1-ER23を保持する形質転換タバコ培養細胞が2クローン (I 1, I 6)、対照として、定常的にpKV1を保持するタバコ培養細胞が2クローン (C 2-1, C 2-4) それぞれ得られた。

4) エリシター結合実験

ERの結合活性は以下のようにして測定した。エリシターとチラミン（東京化成工業社製）の複合体をJong-Joo Cheong [The Plant Cell (1991) 3: 127] らの方法に従い合成した。次に、エリシターとチラミンの複合体をクロラミンTを用いてヨードラベルした。500 μ l のアッセイ用緩衝液 (50mM Tris-HCl pH7.4, 0.1M Saccharose, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA) 中に、得られた標品（タンパク量500 μ g以下）を懸濁し、0℃で2時間インキュベートした後、100nM ヨードラベル化エリシターチラミン複合体 (70Ci/mmol) を加え、4℃で2時間インキュベートした。ワットマンGF/B (0.3%ポリエチレンイミン水溶液で1時間以上処理した) で反応溶液を濾過した後、5mlの氷冷緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.0, 1M NaCl, 10mM MgCl₂) で3回洗浄し、膜上に残った放射活性をガンマカウンターでカウントした（カウントA）。非特異的結合による影響を除くため、同じサンプルに17 μ Mのエリシターを加えアッセイ用緩衝液に懸濁した後、0℃で2時間インキュベートし、上記と同様の操作を行ない、得られた放射活性のカウントを上記のカウントAから差し引きすることにより、ERの特異的結合によるカウント (Δ cpm)を求めた。得られたカウント数 (Δ cpm)と、実験に用いた全カウント数の商を求め、次いで実験に用いた全エリシター量との積を求めることでエリシター結合蛋白量 (mol数) を計算した。

その結果、対照としてpKV1のDNAを導入したタバコ細胞ではエリシターとの特異的な結合が観察されなかったが、pKV1-ER23のDNAを導入したタバコ細胞ではエリシターとの特異的な結合が観察された（第2表）。よって、上記のようにして

得られた遺伝子はエリシター結合活性を持つタンパクをコードすることが明らかになった。

第2表. タバコ培養細胞のエリシター結合活性

画分	導入したDNA	結合活性 (fmol/mg)
一過的発現	pKV1	< 0
	pKV1-ER23	90.5
定常的発現		
C2-1	pKV1	< 0
C2-4	pKV1	< 0
I 1	pKV1-ER23	150
I 6	pKV1-ER23	196

5) グルカンエリシターの添加による、形質転換タバコ培養細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過的上昇

植物はエリシターをそれに対する特異的な受容体で認識し、ファイトアレキシンの蓄積を促進したり過敏感反応を誘導したりしてカビの侵入を防いでいる。これら抵抗性反応の初期にカルシウムイオンが細胞内に流入することが重要であるとの報告がいくつかの植物においてすでになされており[U. Conrath et al. (1991) FEBS LETTERS 279: 141, M. N. Zook et al. (1987) Plant Physiol. 84: 520, F. Kurosaki et al. (1987) Phytochemistry 26: 1919, C. L. Preisig and R. A. Moreau (1994) Phytochemistry 36: 857]、我々がERを取得する材料に用いたダイズにおいてもカルシウムイオンが細胞内に流入することが引き金となってファイトアレキシンの蓄積が促進される事を示唆する報告がなされている[M. R. Stab and J. Ebel (1987) Arch. Biochem. Biophys. 257: 416]。そこで、ERをもたないタバコ培養細胞に受容体を導入発現させた形質転換タバコ培養細胞を作成し、グルカンエリシター添加によって細胞内カルシウムイオン濃度が変化するようになればその変化が引き金となってダイズ以外の植物(タバコ)

でもグルカンエリシターによって抵抗性反応が誘導され、グルカン細胞壁成分の一つとする幅広い種類のカビに対して抵抗性を示すようになることが期待される。

そこで、形質転換タバコ培養細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度のエリシター添加による影響を調べた。ここでタバコ培養細胞は、カナマイシン選抜で得られた形質転換タバコ培養細胞(I6)及びプラスミドのみ導入したタバコ培養細胞(C2-4)を用いた。培養細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} 測定用蛍光キレーター (Fura-2) のアセトキシメチル誘導体 (Fura-2 AM) を用いて以下のように測定した。

形質転換タバコ培養細胞約2mlを取り(10分間静置で細胞体積約250 μ lに当たる)、600rpm、30秒で細胞を集め上清を捨てた。2mlのタバコ培養用培地を加え、軽く攪拌した後遠心(600rpm, 30秒)し、上清を除き、再度同様の操作を繰り返し培養細胞を洗浄した。洗浄した培養細胞に培地2mlを加え、均一になるよう懸濁し、培地に懸濁した培養細胞1mlを取り、1mlの培地と4 μ lの1mM Fura-2 AM (終濃度2 μ M、同仁化学社製)を加え、30分間室温暗所で時々攪拌しながらインキュベートした。その後、遠心操作(600rpm, 30秒)により2mlの培地で2回細胞を洗浄し、細胞内に取り込まれなかったFura-2 AMを取り除いた。洗浄した培養細胞に2mlの培地を加え、培養細胞を均一に懸濁して培養細胞2mlを蛍光測定用セルに移した。細胞内に取り込まれたFura-2 AMは細胞内エステラーゼにより加水分解を受けてFura-2に変化する。このFura-2が細胞内 Ca^{2+} と結合することによって生ずる蛍光を励起波長335nm、蛍光波長505nmで、培養細胞が沈殿しないようにスターラーで攪拌しながら、測定した。50 μ lのグルカンエリシター(1mg/ml)ないしは脱イオン水を培養細胞に添加して蛍光強度を経時的に測定し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べた。対照実験としてプラスミドのみを導入したタバコ培養細胞についても上記と同様の操作で細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べた。また更に、別の対照実験としてダイズ培養細胞についても上記と同様の操作(但し、培養細胞の洗浄にダイズ細胞用の培地を使用した)を行なった。

ダイズ細胞用の培地組成を以下に記す (NaH₂PO₄・H₂O 75mg/ml, KH₂PO₄ 170mg/ml, KNO₃ 2,200mg/ml, NH₄NO₃ 600mg/ml, (NH₄)₂SO₄ 67mg/ml, MgSO₄・7H₂O 310mg/ml, CaCl₂ 2H₂O 295mg/ml, FeSO₄・7H₂O 28mg/ml, EDTA・Na₂ 37.3

mg/ml, KI 0.75mg/ml, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10.0mg/ml, H_3BO_3 3.0mg/ml, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mg/ml, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/ml, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/ml, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/ml, Inositol 100mg/ml, Nicotinic acid 1.0mg/ml, Pyridoxine $\cdot \text{HCl}$ 1.0mg/ml, Thiamine $\cdot \text{HCl}$ 10.0mg/ml, Glucose 5g/ml, Sucrose 25g/ml, Xylose 250mg/ml, Sodium pyruvate 5.0mg/ml, Citric acid 10.0mg/ml, Malic acid 10.0mg/ml, Fumaric acid 10.0mg/ml, N-Z-amine 500.0mg/ml, 2,4-D 1.0mg/ml, Zeatine riboside 0.1mg/ml, KOH でpH5.7に調製する)。

これらの実験を行なった結果、ダイズ培養細胞ではエリシター添加3分後に約7%蛍光強度が一過的に上昇したが、脱イオン水の添加ではそのような変化は観察されなかった(第4図)。この結果は、本実験法によってERがグルカンエリシターと結合することによって一過的に細胞内に Ca^{2+} を流入させる現象を観察できることを示唆しており、ダイズ培養細胞でエリシターによって引き起こされる抵抗性反応にカルシウムイオンが重要な役割を果たしているとの報告を支持している。形質転換タバコ培養細胞ではエリシター添加3分後に約10%蛍光強度が一過的に上昇したが、脱イオン水の添加ではそのような変化は観察されなかった。

また、プラスミドのみを導入したタバコ培養細胞では形質転換タバコ培養細胞で生じたエリシター添加による蛍光強度の変化は観察されなかった(第5図)。

これらの結果はグルカンエリシターに反応性の無かったダイズ以外の植物(タバコ)にダイズ由来のグルカンエリシター受容体を導入発現させるとグルカンエリシターに対する反応性を新たに獲得する事を示している。それぞれの植物におけるシグナル伝達経路に関しては未だ未知の部分が多く残されているが、タバコ以外の植物でも本ERを導入発現させればグルカンエリシターに対する反応性(細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過的な上昇)を獲得し、ひいてはグルカンをその細胞壁成分の一つとする幅広い種類のカビに対して抵抗性を示す植物の育種が可能になると期待される。

〔実施例4〕 ダイズERの大腸菌での発現とエリシター結合ドメインの決定

1) 大腸菌でのエリシター結合ドメインの発現

ダイズERの部分断片を大腸菌で発現させるためマルトース結合蛋白(MBP)との融合蛋白の作成をニューイングランドバイオラボ社製のProtein Fusion & Purif

ication Systemを用いて行なった。pER23-1を鋳型に用いてPCRを行ない、様々な長さのDNA断片を取得した。プライマーは、第6図に示すダイズERの全長および断片をコードするDNAの外側に、5'側はBamHI部位を、3'側はSalI部位をあらかじめ付加しておき、プラスミドpMAL-c2（ニューイングランドバイオラボ社製）にクローニングした際にMBPと融合蛋白が産生するようにデザインした。これらプライマーを自動核酸合成機（アプライドバイオシステム社モデル394）を用いて合成した。DNA鎖の増幅には以下のプライマーを用いた。

プライマーU35 5'-ATGGATCCATGGTTAACATCCAAACC-3'（配列番号17）

プライマーU36 5'-ATGGATCCGAATATAACTGGGAGAAG-3'（配列番号18）

プライマーU37 5'-ATGGATCCCCAGCATGGGGTAGGAAG-3'（配列番号19）

プライマーU38 5'-TAGTCGACTACTTCTCCAGTTATATTC-3'（配列番号20）

プライマーU39 5'-TAGTCGACTACTTCTACCCCATGCTGG-3'（配列番号21）

プライマーU40 5'-TAGTCGACTATTCATCACTTCTGCTATG-3'（配列番号22）

プライマーU41 5'-ATGGATCCGCCCCACAAGGTCCCAA-3'（配列番号23）

プライマーU42 5'-ATGGATCCAATGACTCCAACACCAAG-3'（配列番号24）

0.01 μ gのpER23-1DNAを79 μ lの蒸留水に溶解し、10 μ lの10xPCRバッファー（宝酒造社製Taq DNAポリメラーゼに添付）、8 μ lの2.5mM dNTPにプライマーU5とU7もしくはU10とU12をそれぞれ100 pmolずつ及び0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を加え最終100 μ lとし、以下の要領にてPCR反応を行なった。反応装置はパーキンエルマー社製ジーンアンプPCRシステム9600を用いた。反応条件は1) 94℃; 30秒、2) 55℃; 30秒、3) 72℃; 1分で1) 2) 3)を30回繰り返した。反応後、15 μ lを制限酵素BamHIとSalIで切断し、1%アガロースゲル電気泳動にかけた。

電気泳動に供した上記ゲルを0.5 μ g/mlの臭化エチジウム溶液で15分間染色し、UV下で観察して、想定される特異的に増幅が観察できた断片を切り出した。同ゲル断片はジーンクリーンII（バイオ101社製）によって処理し、DNAを含む溶液を回収した。回収したDNA断片をプラスミドpMAL-c2のBamHI-SalI部位にクローニングし大腸菌DH5 α に導入した。

2) 大腸菌からの可溶化蛋白画分の調製

それぞれのプラスミドを導入した大腸菌を1晩、発現培地(10g/lトリプトン; ギブコ社製、5g/l酵母抽出物; ギブコ社製、5g/l NaCl、2g/lブドウ糖、100ppm アンピシリン)で前培養した培養液0.4mlを40mlの発現培地に添加し、OD₆₀₀=0.55になるまで37℃で振盪培養した。最終濃度0.3mMになるようにイソプロピルチオガラクトサイドを加えさらに4時間振盪培養を継続し、発現の誘導を行なった。大腸菌を遠心分離で回収後、洗浄バッファー(20mM Tris-HCl, pH7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA)で菌体を洗浄し、超音波処理(15秒ずつ2分間)で細胞を破碎し、終濃度0.25% ZW3-12添加後 30分間 4℃でインキュベート後、遠心分離(10,000 rpm, 5分)により上清を回収し、大腸菌可溶化蛋白画分を得た。融合蛋白が発現していることは、抗マルトース結合蛋白抗体(ニューイングランドバイオラボ社製)を用いたイムノブロット法により確認した。

3) エリシター結合実験

エリシターとの結合活性は以下のようにして測定した。エリシターとチラミン(東京化成工業社製)の複合体をJong-Joo Cheong [The Plant Cell (1991) 3: 127]らの方法に従い合成した。次に、エリシターとチラミンの複合体をクロラミンTを用いてヨードラベルした。500 μ lのアッセイ用緩衝液(50mM Tris-HCl pH7.4, 0.1M Saccharose, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 5mM EDTA)中に、得られた標品(タンパク量800 μ g以下)を懸濁し、0℃で2時間インキュベートした後、10nM ヨードラベル化エリシター-チラミン複合体(70Ci/mmol)を加え、4℃で2時間インキュベートした。ワットマンGF/B(0.3%ポリエチレンイミン水溶液で1時間以上処理した)で反応溶液を濾過した後、5mlの氷冷緩衝液(10mM Tris-HCl pH7.0, 1M NaCl, 10mM MgCl₂)で3回洗浄し、膜上に残った放射活性をガンマカウンタでカウントした(カウントA)。非特異的結合による影響を除くため、同じサンプルに17 μ Mのエリシターを加えアッセイ用緩衝液に懸濁した後、0℃で2時間インキュベートし、上記と同様の操作を行ない、得られた放射活性のカウントを上記のカウントAから差し引きすることにより、ERの特異的結合によるカウント(Δ cpm)を求めた。得られたカウント数(Δ cpm)と、実験に用いた全カウント数の商を求め、次いで実験に用いた全エリシター量との積を求める

ことでエリシター結合蛋白量 (mol数) を計算した。

ERのDNAを導入した大腸菌でもエリシターとの特異的な結合が観察された (第6図)。よって、上記のようにして得られた遺伝子はエリシター結合活性を持つタンパクをコードすることが再確認できたとともに、配列番号1中の239から442のアミノ酸配列中にエリシター結合ドメインが存在することが明かとなった。

〔実施例5〕 エリシター結合ドメインの抗体によるグルカンエリシターとダイズ子葉膜画分のエリシター結合タンパクとの結合阻害とダイズ子葉のファイトアレキシン蓄積阻害

1) 大腸菌でのエリシター結合ドメインの発現

ER由来の大量のエリシター結合ドメインを大腸菌で発現させるためマルトース結合蛋白(MBP)との融合蛋白の作成をニューイングランドバイオラボ社製のProtein Fusion & Purification Systemを用いて行なった。エリシター結合ドメインをコードするDNAを得るためPCRを用いた。以下のプライマーを自動核酸合成機 (アプライドバイオシステム社モデル394) を用いて合成し用いた。プライマーU36 5' -ATGGATCCGAATATAACTGGGAGAAG-3' (配列番号25)

プライマーU39 5' -TAGTCGACTACTTCCTACCCCATGCTGG-3' (配列番号26)

0.01 μ g のpER23-1DNAを79 μ lの蒸留水に溶解し、10 μ lの10x PCRバッファー (宝酒造社製Taq DNAポリメラーゼに添付)、8 μ lの2.5mM dNTPにプライマーU5とU7もしくはU10とU12をそれぞれ100 pmolずつ及び0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を加え最終100 μ lとし、以下の要領にてPCR反応を行なった。

反応装置はパーキンエルマー社製ジーンアンプPCRシステム9600を用いた。反応条件は1) 94℃; 30秒、2) 55℃; 30秒、3) 72℃; 1分で1) 2) 3) を30回繰り返した。反応後、15 μ lを制限酵素BamHIとSalIで切断し、1%アガロースゲル電気泳動にかけた。電気泳動に供した上記ゲルを0.5 μ g/mlの臭化エチジウム溶液で15分間染色し、UV下で観察して、特異的な増幅が観察できた断片を示すバンドを切り出した。同ゲル断片はジーンクリーンII (バイオ101社製) によって処理し、DNAを含む溶液を回収した。回収したDNA断片をプラスミドpMAL-c2のBamHI-SalI部位にクローニングし大

腸菌DH5 α に導入した。

2) 大腸菌で発現した融合蛋白の精製と抗体の作成

プラスミドを導入した大腸菌を1晩、発現培地(10g/lトリプトン; ギブコ社製、5g/l酵母抽出物; ギブコ社製、5g/l NaCl、2g/lブドウ糖、100ppmアンピシリン)で前培養した培養液150mlを1.5lの発現培地に添加し、OD600=0.55になるまで37℃で坂口フラスコにて振盪培養した。最終濃度0.3mMになるようにイソプロピルチオガラクトサイドを加えさらに4時間振盪培養を継続し、発現の誘導を行なった。大腸菌を遠心分離で回収後、洗浄バッファー(20mM Tris-HCl, pH7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA)で菌体を洗浄し、超音波処理(15秒ずつ2分間)で細胞を破碎した。遠心によって得られた可溶性蛋白画分からMBP融合蛋白をアミロースレジンで精製、さらにファクターXaでMBPとエリシター結合ドメインを切断後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製蛋白(エリシター結合ドメイン)を得た。精製蛋白はE. Harlow とD. Lane [Antibody (1988) コールドスプリングハーバー社, pp. 53-137]の方法に従い、マウス腹腔に2回免疫感作を行なった。力価が上昇したことをELISA法で確認した後、腹水を取得し、50%飽和硫酸沈殿、プロテインAセファロース(ファルマシア社製)で処理(0.1 Mリン酸ナトリウム pH 8.0で抗体を結合し、0.1 M クエン酸 pH 3.5で溶出した。)して抗体の精製を行なった。免疫ブロット法では、得られた抗体は、ダイズにおいてはER蛋白のみを認識することが確認された。

3) ダイズ子葉膜画分の調製

ダイズ子葉膜画分の調製は以下のように行なった。

実施例1の2)に記載されたダイズ根の膜画分調製法に従い、土壌栽培(9日間)したダイズ子葉(湿重、36g)に47mlの氷冷バッファー(25mM Tris-HCl pH 7.0, 30mM MgCl₂, 2mM dithiothreitol, 2.5mM sodium metabisulfite, 1mM PMSF)を加え、ワーリングブレンダーでホモゲナイズした後、遠心分離により分画し、子葉膜画分の沈殿を得た。得られた子葉膜画分を1mlの氷冷バッファー(10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M sucrose, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA)に懸濁し-80℃で保存した。

4) ダイズ子葉膜画分のエリシター結合タンパクとグルカンエリシターの結合反

応の阻害活性測定

エリシターとの結合活性は以下のようにして測定した。エリシターとチラミン（東京化成工業社製）の複合体を Jong-Joo Cheong [The Plant Cell (1991) 3: 127] らの方法に従い合成した。次に、エリシターとチラミンの複合体をクロラミンTを用いてヨードラベルした。500 μ l のアッセイ用緩衝液（50mM Tris-HCl pH7.4, 0.1M Saccharose, 5mM $MgCl_2$, 1mM PMSF, 5mM EDTA）中に、ダイズ子葉膜画分（100 μ l, 820 μ g）を懸濁し、0 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした後、714ng (143 nM) のヨードラベル化エリシター-チラミン複合体（70Ci/mmol）を加え、4 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。ワットマンGF/B（0.3%ポリエチレンイミン水溶液で1時間以上処理した）で反応溶液を濾過した後、5mlの氷冷緩衝液（10mM Tris-HCl pH7.0, 1M NaCl, 10mM $MgCl_2$ ）で3回洗浄し、膜上に残った放射活性をガンマカウンターでカウントした（カウントA）。非特異的結合による影響を除くため、同じサンプルに約100倍量（75 μ g, 15 μ M）のコールドエリシターを加えアッセイ用緩衝液に懸濁した後、0 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートし、上記と同様の操作を行ない、得られた放射活性のカウントを上記のカウントAから差し引きすることにより得られた、ERの特異的結合によるカウント（ Δ cpm）を100%として、コールドエリシターの代わりにそれぞれ3.6、7.1、10.8、14.4、28.8 μ gの精製抗体を加えインキュベートして得られた結合カウント数をカウントAから差し引いて得られる値を求め、コールドエリシターで得られたカウント数との比較をパーセントで表した（第7図）。28.8 μ gの抗体で51%程エリシターの結合が阻害された。この結果によって、エリシター結合ドメインの抗体が確かにエリシターとエリシター結合タンパクとの結合を阻害しうることが確認できた。

5) エリシター結合ドメインの抗体によるファイトアレキシン蓄積阻害

ダイズ子葉を用いたグルカンエリシターによるファイトアレキシン蓄積量の測定はM. G. Hahnらの[(1992) Molecular Plant Pathology Volume II A Practical Approach, IRL Press pp. 117-120]方法にしたがった。

エリシター結合ドメインに対する精製抗体それぞれ（0、1、2、3、4、10、20 μ g/25 μ l/子葉1枚）及び対照として酵母由来のdsRNAaseであるpac 1に対する精製抗体それぞれ（4、10、20 μ g/25 μ l/子葉1枚）をダイズ子葉切断面に滴下し、1

時間インキュベートした後、グルカンエリシター溶液（200ng/25 μ l/子葉1枚）を更にダイズ子葉切断面に滴下し、20時間インキュベートしてグルカンエリシターによるファイトアレキシン蓄積が抗体によって阻害されるかを調べた。エリシター単独で蓄積されるファイトアレキシン量を100%として、抗体を添加した後エリシターを添加することによって誘導蓄積されるファイトアレキシン量をパーセントで表した（第8図）。ダイズ子葉1枚当たり20.0 μ gのエリシター結合ドメインに対する抗体を加えた場合、約53%ファイトアレキシンの蓄積量が減少したが、対照のpac 1抗体ではダイズ子葉1枚当たり20.0 μ gを加えてもファイトアレキシンの蓄積量はほとんど変化しなかった。これらの結果から、取得された遺伝子は単なるエリシター結合蛋白ではなく、ダイズの抵抗性反応を引き起こすERをコードしていることが示された。

〔実施例6〕 ER遺伝子のタバコ植物体への導入

ダイズ由来のER遺伝子を次のようにしてタバコに組み込み発現を確認した。

1) 植物体発現用ベクタープラスミドの構築

pER23-1をBamHIとSalIで切断する事により両酵素で挟まれたER遺伝子断片が得られる。これを次に述べる植物用のベクターに挿入する。一方、植物発現型バイナリープラスミドpBI121(Clontech社製)を制限酵素BamHIとSacIで切断して、自動核酸合成機を用いて合成した下記に示す合成リンカー用DNAをアニーリングした後、ライゲーションで組み込み、大腸菌DH5 α に形質転換した。得られたクローンの中から目的のプラスミドpBIlinkerを得た。

5'-CTAGAGGATCCGGTACCCCCGGGGTCGACGAGCT-3'（配列番号27）

5'-CGTCGACCCCCGGGGTACCGGATCCT-3'（配列番号28）

得られたプラスミドpBIlinkerのカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターとノパリン合成酵素のターミネーターの間(BamHI-SalI)に前述した導入遺伝子を挿入することにより、植物への導入用ベクター（pBI-ER）を得た。

2) pBI-ERのアグロバクテリウムへの導入

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Clontech社製)を50mlのYEB培地（1l当たりビーフエキス5g、酵母エキス1g、ペプトン1g、シヨ糖5g、2mM MgSO₄ (pH7.4)）に接種し、28℃で24時間培養後、培養液を3,000rpm、4℃、20分の遠

心で集菌した。菌体を 10ml の 1 mM Hepes-KOH (pH 7.4) で 3 回洗った後、3 ml の 10% グリセロールで 1 回洗い、最終的に 3 ml の 10% グリセリンに懸濁して DNA 導入用アグロバクテリウムとした。

このようにして得た菌液 50 μ l 及び前記のプラスミド pBI-ER 1 μ g をキューベットに入れ、エレクトロポレーション装置 (Gene Pulser; BioRad 社製) を用いて 25 μ F、2500V、200 Ω の条件で電気パルスをかけ、プラスミド DNA をアグロバクテリウムに導入した。この菌液をエッペンドルフチューブに移し、800 μ l の SOC 培地 (1 l 当たりトリプトン 20 g、酵母エキス 5 g、NaCl 0.5 g、2.5 mM KCl、10 mM $MgSO_4$ 、10 mM $MgCl_2$ 、20 mM グルコース、pH 7.0) を加え、28°C で 1.5 時間静置培養した。この培養液 50 μ l を、100 ppm のカナマイシンを含む YEB 寒天培地 (寒天 1.2%) 上にまき、28°C で 2 日間培養した。

得られたコロニー群からシングルコロニーを選び、このコロニーからアルカリ法でプラスミド DNA を調製した。このプラスミド DNA を適当な制限酵素で消化後、1% アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し解析したところ、プラスミド pBI-ER を含んでいることが確認できた。この *Agrobacterium tumefaciens* を Agro-ER と呼ぶ。

3) タバコの形質転換

上記の菌株 Agro-ER を、50 ppm のカナマイシンを含む LB 液体培地で 28°C、2 時間振とう培養した。培養液 1.5 ml を 10,000rpm、3 分間遠心して集菌後、カナマイシンを除くために 1 ml の LB 培地で洗浄した。更に 10,000rpm、3 分間遠心して集菌後、1.5 ml の LB 培地に再懸濁し感染用菌液とした。

タバコ (品種 ブライトイエロー) への感染に当たっては、無菌植物体より若い葉を採取し、感染用の葉とした。この葉を 1 片が 1 cm^2 になるようにメスで無菌的に切断し、上記のアグロバクテリウムの菌液上に葉の裏を上にして置き、2 分間静かに振とうした後、滅菌済みの濾紙上に葉を置いて過剰のアグロバクテリウムを除いた。シャーレ内の MS-B5 培地 (ベンジルアデニン 1.0 ppm、ナフタレン酢酸 0.1 ppm、及び寒天 0.8% を含む) (Murashige, T. and Skoog, F. Plant Physiol., 15: 473, (1962)) 上に、ワットマン No. 1 濾紙 (ϕ 7.0 cm) を置き、この濾紙に裏を上にして葉を置いた。シャーレをパラフィルムでシールし、

16時間明、8時間暗の周期で 25℃、2日間培養した。ついでクラフォラン 250 ppmを含む MS-B5培地上に移し、同様に 10日間培養してアグロバクテリウムを除去した。更にクラフォラン 250 ppm及びカナマイシン 100 ppmを含む MS-B5培地上に置床し、同様に 7日間培養した。この間に葉片の周囲がカルス化し、シュート原基が生じた。更に 10日間培養後、伸張したシュートをクラフォラン 250 ppm及びカナマイシン 100 ppmを含む MS-HF培地（ベンジルアデニン及びナフタレン酢酸を含まない MS-B5培地）に置床した。10日間培養後、発根したシュートをカナマイシン耐性の形質転換体とし、プラントボックス内のクラフォラン 250 ppmを含む MS-HF培地に移植した。

4) 形質転換タバコのゲノムPCR及びイムノブロット解析

目的遺伝子の導入を確認するため、PCRを行なった。以下のプライマーを自動核酸合成機（アプライドバイオシステム社モデル 394）を用いて合成し用いた。

プライマー-ER1 5'-CACCTTCAGCAACAATGGTT-3'（配列番号 29）

プライマー-ER2 5'-CTATTCATCACTTCTGCTAT-3'（配列番号 30）

カナマイシン耐性のタバコからDNAを抽出し調査した。ゲノムDNAの抽出法は以下のように行なった。20mgのタバコの葉を200 μ lの抽出バッファー(0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8, 50mM EDTA)中でプラスチック棒で破碎し、20%ポリビニルピロリドン（平均分子量40キロダルトン）を60 μ l、10% SDSを52 μ l加え、65℃で30分間加温する。その後、5M 酢酸カリウムを40 μ l加え、氷上に30分間放置する。遠心分離にて上清を回収し、180 μ lのイソプロピルアルコールにて沈殿としてDNAを回収した。70%エタノールで洗浄後、150 μ lのTE溶液(10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, 1 μ g/ml RNase A)に溶解した。当DNA溶液を1 μ l、79 μ lの蒸留水に、10 μ lの10x PCRバッファー（宝酒造社製Taq DNAポリメラーゼに添付）、8 μ lの2.5mM dNTPにプライマー-ER1とER2をそれぞれ100 pmolずつ及び0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を加え最終量100 μ lとし、以下のようにPCR反応を行なった。反応装置はパーキンエルマー社製ジーンアンプPCRシステム9600を用いた。反応は、まず、変性反応94℃5分を行なった後、1) 変性94℃；30秒、2) 再生55℃；30秒、3) 伸長72℃；1分の操作を30回繰り返して行った。反応後、反応液の15 μ lを

1 %アガロースゲル電気泳動にかけた。電気泳動に供した上記ゲルを0.5 μ g / ml の臭化エチジウム溶液で15分間染色し、UV下で観察した。増幅が予想される約2 kbpの特異的DNA断片を確認することにより目的遺伝子がタバコゲノムに組み込まれていることを確認した。

また、導入遺伝子の発現を調べるために免疫ブロット解析を行なった。20mgのタバコの葉を100 μ lの氷冷した抽出バッファー(0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 1mM PM SF)中でプラスチック棒で破碎し、3 x SDS-pageサンプルバッファー(30%グリセリン, 3% β メルカプトエタノール, 3% SDS, 0.19M Tris-HCl, pH 6.8, 0.001% BPB)を50 μ l加え、100℃で5分間加温した。抽出した蛋白質(12,000rpm 5分間、遠心分離した上清)15 μ lをSDSポリアクリルアミド電気泳動を行ない、PVDF膜(ミリポア社製)に転写し、1次抗体として実施例5で作成した抗ER・マウス抗体を、2次抗体として抗マウス免疫グロブリン・アルカリフォスファターゼ標識抗体(ジャクソン社製)を、さらにアルカリフォスファターゼ発色基質(和光純薬社製)を用いて、免疫ブロット解析を行ないER蛋白の発現を検定した。様々の量のER蛋白を発現している個体があったが、その中から発現量の多い個体について過敏反応試験、カビ耐性試験を行なった。

〔実施例7〕 形質転換タバコの過敏反応試験

実施例6でER蛋白の高発現が確認されたタバコ形質転換体、及び対照として形質転換を行っていないタバコや、ベクター(pBI121)のみを形質転換したものの葉に対してダイズエリシターによる過敏反応の誘導を検討した。

温室内で育成した植物体の葉を葉柄で切り取り、光を透過するプラスチック箱に置床する。葉の表側の面に直径5mm、高さ5mmの切断したシリコンチューブを置き、溶液を保持できるようにする。ここにバッファー溶液(3mM Sodium Bicarbonate, 4 mM Sodium Acetate, pH 8.0)に溶解した化学合成グルカンエリシター(β -D-glucoside) [N. Hong and T. Ogawa (1990) Tetrahedron Lett. 31:3179—理化学研究所及び東京大学 小川教授より分譲]、もしくはバッファー溶液のみを保持し葉面に接触添付させ、乾燥を防ぐよう過湿状態で16時間明、8時間暗の周期で25℃、7日間培養した。培養後、シリコンチューブを除き、UVイルミネーター(フナコシ社製)上でタバコ・ファイトアレキシンの合成誘導を観察

した。形質転換をしていないタバコ、ベクターのみを形質転換したタバコに化学合成グルカンエリシターを添付したものの組み合わせでは、何も観察できなかった。このことはタバコはこのグルカンエリシターを認識できないことを示す。一方、ERを形質転換したタバコTF1-11-1-15に化学合成グルカンエリシターを添付した組み合わせでは著量の蛍光物質（ファイトアレキシン）の蓄積が認められた。また対照として、バッファー溶液や脱イオン水を添付したものの組み合わせでは、変化は観察できなかった。

これらの結果から、当該遺伝子をダイズ以外の宿主植物で発現させることができれば、宿主植物が認識できないグルカンエリシターを新たに認識できる可能性が証明された。また、本発明は、植物の物質の認識を変化させる可能性ばかりでなく、グルカン構造を細胞壁等に持つカビ等の植物病原菌を植物が認識できる機構を提供し、それにより耐病性に深く関与するファイトアレキシンの誘導など、抵抗性反応が誘起される。このような抵抗性反応を誘起することは、耐病性植物を育種するうえで重要なことである。

〔実施例 8〕 形質転換タバコのカビ耐性試験

実施例 6 で ER 蛋白の高発現が確認されたタバコ形質転換体を自殖することや、グルカナナーゼ発現タバコ（特開平4-320631）との交配他殖することにより次世代である種子を採取した。

1) タバコ疫病菌(*Phytophthora nicotianae*) に対する抵抗性

北海道大学保存菌株（PDA培地：ディフコ社製で継代）をオートミールアガーに移し、26℃ 4日間培養し、培地全面に広がった菌糸の先端部分をコルクボーラーで打ち抜いた菌糸ディスクを接種源とした。ここで用いたオートミール寒天培地の作り方を以下に述べる。オートミール（エンバク）粉末100 g を1 L の水に懸濁し、58℃ 1時間加熱後ガーゼで濾過し、濾液に寒天20 gを加えオートクレーブ後、シャーレに分注し培地として用いた。

取得した種から得た実生を実施例 6 に基づきERの顕著な発現が確認できた植物体に対して、有傷接種をおこなった。プラスチック箱の中に湿らせた濾紙をしいた上に、発芽からおよそ2箇月後のタバコ植物から切り取った葉を並べ、それぞれの葉に左右1箇所ずつ、束ねた10本の針を葉に30回あて、同心円状の刺し

傷をつけてから、脱イオン水を有傷部に少量添加したのち菌糸ディスクを接種し、25℃で96時間おいた。上記試験の結果を第9図および第3表に示す。無病徴を4、1枚のタバコの左右それぞれ半分のスペースに25%まで病徴が現れたものを3、50%までを2、75%までを1、75%以上病徴を示したものを0とした抵抗性指数にて、各供試タバコ葉の値を計数した。

第3表. タバコ疫病菌 (*P. nicotiana*) に対する抵抗性

タバコ植物	P-1	2	3	4	5	6	7	G-1	4	6	7	8	9	10
個体No.														
抵抗性指数	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1

タバコ植物	ER-51	55	56	57	GxER-10	11	16	24	28	34	38
個体No.											
抵抗性指数	0	0	1	0	2	4	2	1	1	2	2

P: pBI121 形質転換タバコ (コントロール)

G: グルカナーゼ発現タバコ

ER: ER発現タバコ

GxER: グルカナーゼ、ER共発現タバコ

その結果、対照植物 (pBI121により形質転換した植物やグルカナーゼ単独を発現している植物) では病斑の形成及び拡大が観察されたのに対し、ERとグルカナーゼを発現している形質転換植物の大部分では病斑の拡大はあまり観察されなかった。従って、ER遺伝子の導入によりカビ耐性が向上したと考えられる。

2) タバコ腰折病菌 (*Rhizoctonia solani*) に対する抵抗性

岐阜大学保存菌株 (*Rhizoctonia solani*: AG3 M strain, 岐阜大学百町教授より分譲、PDA培地: ディフコ社製で継代) を大麦粒と同量の脱イオン水を加え

オートクレーブ滅菌したものに接種し、24℃10日間培養ののち、10日間乾燥し、大麦粒をコーヒーマーカで粉碎し土壌（川砂：パーミキュライト：ピートモス＝2：2：1）と0.5%（w/w）、の割合で良く混合し、供試種子を蒔いた。16時間明、8時間暗の周期で25℃、湿度60-80%にて生育を観察した。各供試タバコの健全個体数の値を計数した（第10図及び第11図）。

その結果、対照植物（非形質転換タバコ）では病斑の形成及び拡大が観察され健全植物体が激減し、大部分が枯死したのに対し、ERを発現している形質転換植物ではほとんど病斑は観察されないか、病徴の遅延が観察できた（第10図）。従って、ER遺伝子の導入によりカビ耐性が向上したと考えられる。

3) タバコ疫病菌 (*Phytophthora nicotianae*) の遊走子を用いたカビ耐性試験

実施例8の1) に記載した針接種法によるカビ耐性試験に加え、遊走子懸濁液接種法によるカビ耐性試験を行った。北海道大学保存菌株（PDA培地：ディフコ社製で継代）をオートミールアガー（オートミール（エンバク）粉末100gを1Lの水に懸濁し、58℃1時間加熱後ガーゼで濾過し、濾液に寒天20gを加えオートクレーブ後、シャーレに分注し培地として用いた）に移し、25℃暗黒下で一週間培養した菌そうから、直径6mmのコルクボーラーでディスクを打ち抜き、それを9cmプラスチックシャーレ一枚当り7個、等間隔に置き、そこにダイズ煎汁培地（枝豆400gを磨碎しガーゼで濾過し、蒸留水を加えて1リットルとしオートクレーブしたもの）を25ml加え、25℃暗黒下で3日間培養した。シャーレのほぼ全面に菌糸のマットが形成されていることを確認し、培地を捨て、ペトリ水溶液（1mM KCl, 2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 ）で3ないし4回マットを洗浄し培地成分を可能なかぎり除去し、最後に土壌抽出液（野外の土壌11.5gに水を加えて1リットルとし濾過後オートクレーブしたもの）で一回洗浄し、水分を切って15℃、照明下で菌糸マットの表面がやや乾燥するまで数日放置した。この乾燥という処理が、本菌の遊走子嚢大量形成に非常に重要であることが、今回始めて明かとなった。このようにして形成した遊走子嚢に土壌抽出液を加えて、15℃、照明下で2-3時間静置し、十分量の遊走子形成を確認した後にこれを回収し接種源とした。

実施例6に基づきERの顕著な発現が確認できた植物体に対して、遊走子を接種

した。プラスチック箱の中に湿らせた濾紙をしいた上に、発芽からおよそ4箇月後のタバコ植物から切り取った葉を並べ、それぞれの葉に左右1箇所ずつ約5mmの長さに切断したシリコンリングをのせた後、遊走子懸濁液 ($3-5 \times 10^5$ 個/ml) 100 μ l をマイクロピペットを用い、シリコンリング内に添加することによってタバコ葉表面に遊走子を接種し、25°Cで144時間おいた。上記試験の結果を第12図及び第4表に示す。

無病徴を4、接種部分に病斑が限定されているものを3.5、半葉の25%まで病徴が現れたものを3、37.5%までを2.5、50%までを2、75%までを1、75%以上を0とした抵抗性指数にて各試供タバコ葉の値を計数した。

第4表. タバコ疫病菌 (*P. nicotianae*) の遊走子に対する抵抗性

タバコ植物	BY-1	2	3	4	5	6	7	8	G-1	2	3
個体No.											
抵抗性指数	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
タバコ植物	ER-1	2	3	4	5	6	GxER-1	2	3	4	5
個体No.											
抵抗性指数	4	1	3	3	2.5	3.5	3.5	2	3	3	0

BY : 非形質転換タバコ (コントロール)

G : グルカナーゼ発現タバコ

ER : ER発現タバコ

GxER : グルカナーゼ、ER共発現タバコ

その結果、対照植物 (非形質転換タバコやグルカナーゼ単独を発現しているタバコ植物) では病斑の形成及び拡大が観察されたのに対し、ER単独ならびにER及

びグルカナーゼを発現している形質転換植物の大部分では病斑の拡大は抑制された。従って、ER遺伝子の導入によりカビ耐性が向上したと考えられる。

〔実施例9〕 新規なインゲングルカナーゼのクローニング

1) ダイズmRNAの取得

インゲン（平莢ファンシー菜豆）種子（タカヤマシード社製）を12日間バーミキュライトで栽培した後、グルカナーゼの発現を誘導する目的で、U. Vogeli [Planta (1988) 174: 364]らの方法に従いインゲンを48時間エチレン処理した。植物体を液体窒素により凍結し使用するまで-80℃で保存した。石田（細胞工学実験操作入門／石田・三沢著、講談社サイエンティフィク）らの方法に従い、12gの凍結インゲンパウダーより全RNA2.35mgを取得した。

上記で得られた全RNA 1.0mgをOligo (dT) cellulose（ファルマシア社製）を用いてマニュアルに従い精製し、31.5μgのpoly(A)+RNAを精製した。

2) インゲンcDNAライブラリーの作成

5μgのpoly(A)+RNAをTime Saver cDNA合成キット（ファルマシア社製）を用いランダムヘキサマープライマーを用いて、cDNAを合成した。合成したcDNA断片はラムダファージベクターλgt10（ストラタジーン社製）にT4リガーゼ（宝酒造社製）を用いて連結した。さらにDNA混合溶液を用いて、ファージ粒子にギガパック（ストラタジーン社製）を用いてパッケージングし、約10万pfuのインゲンのcDNAライブラリーを作成した。

3) スクリーニング用プローブの作製

B. V. Edington [Plant Molecular Biology (1991) 16:81]らの行ったインゲングルカナーゼcDNAクローニングの報告に基づき、PCRプライマーを作製し、センスプライマー：5'-CAAATGTTGTGGTGAGGGATGCCC-3'（配列番号31）、アンチセンスプライマー：5'-AAATGTTTCTCTATCTCAGGACTC-3'（配列番号32）、石田の方法（遺伝子高発現実験マニュアル／石田・安東編、講談社サイエンティフィク）に従い、RT-PCRによって約300bpのPCR断片を得て、これをpBluescriptSKII+（ストラタジーン社）のEcoRV部位にサブクローニングした。cDNA合成には、1mgの全RNA及び0.5mgのランダムヘキサマープライマー（宝酒造社製）を用いた。サブクローンプラスミド中のインサート（0.3kbp）のDNA塩基配列を決定した結果、

B. V. Edingtonら（上記）の報告したグルカナーゼcDNAと同一のものであることが明かとなった。このプラスミドDNAをHindIIIとEcoRIで消化し、アガロース電気泳動にて分画してジーンクリーンII（バイオ101社製）にてインサートDNAを精製して、2）で作製したインゲンcDNAライブラリーのスクリーニングプローブとして使用した。

4）ハイブリダイゼーションによるライブラリーのスクリーニングとクローニング

スクリーニング用プローブとして得られたDNA断片をメガプライムDNA標識システム（アマシャム社製）を用い、マニュアルに従って[α -32P]dCTPにてラベル化し、反応液をハイブリダイゼーションの実験に供した。

2）で作製したインゲンcDNAライブラリーを大腸菌C600 hfl（インビトロジェン社製）に感染させ、10mg/mlのMgCl₂を含むL培地を入れた直径約15cmのシャーレにまいて総数約10万個のプラークを形成させた後、ナイロンメンブレン（GeneScreen(+)；NENデュポン社製）にブロッティングした。32P-dCTPで標識したグルカナーゼcDNA断片をこのメンブレンと反応させ、オートラジオグラフィによって検出した陽性ファージを再度同様にスクリーニングすることにより、1個のファージクローンを得た。

ハイブリダイゼーション実験より単離したポジティブなクローンのファージ液からラムダソープ（プロメガ社製）を用いて λ ファージDNAを精製した。5 μ gのDNAをEcoRI消化して、1%アガロースゲル電気泳動で分離し、約1.2kbのバンドを切り出し、ジーンクリーンII（バイオ101社製）によって処理し、DNAを含む溶液を回収し、ベクターpBluescriptII KS+（ストラタジーン社製）のEcoRI部位にサブクローニングした。プラスミドpPGIの構成を第13図に示す。

5）インゲングルカナーゼをコードするクローンのDNA塩基配列の決定

グルカナーゼのcDNAがクローニングされているプラスミドからキョシーケンス用ディリレーションキット（宝酒造社製）を用いて、ほぼ200-300bpごとに欠失したプラスミドを作成し、これらを用いて蛍光シーケンサーで両方向のDNA塩基配列を決定した。そのDNA塩基配列を配列表の配列番号33に示す。その結果、そのDNA断片中にはシグナル配列と予想されるアミノ酸配列に対応する

塩基配列を先頭に993bpからなるORFが存在し、331残基のアミノ酸がコードされていると推定された。このアミノ酸配列を配列表の配列番号34に示す。

得られたDNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列はBLAST Protein Searchで検索したところ全く新規の配列であり、以前B. V. Edington [Plant Molecular Biology (1991) 16:81]らが報告したアミノ酸配列とシグナル配列に当たる部分を除いた部分を比較すると49%の相同性があり、Y. Takeuchi [Plant Physiol. (1990) 93:673]らが報告したダイズ由来のアミノ酸配列とは全長で51%の相同性が認められた。以前報告されているグルカナーゼと高い相同性を示すことから得られたDNA配列もグルカナーゼをコードしていることが予測された。また、N末端側にシグナル配列と予想される配列を持ち、C末端側に液胞ターゲティング配列と予想される配列を欠くことから以前報告されているインゲングルカナーゼとは異なり細胞外に分泌されるタイプのグルカナーゼであることが予測された。

〔実施例10〕 インゲングルカナーゼの発現

1) プラスミドpGST-PG1の構築

グルタチオンSトランスフェラーゼ発現ベクター（ファルマシア社製、pGEX-4T-3）の下流にインゲングルカナーゼのシグナル配列（N末のMet(1)～Val(21)）を除いた部分をインフレーションでつなげられるように、PCRセンスプライマー：5'-GGAATTCCGAATCTGTGGGTGTGTTAT-3'（配列番号35）、アンチセンスプライマー：M13リバーシークエンスプライマー（配列番号36）をデザインした。このプライマーを用いて、0.1mgのプラスミドpPG1DNAをテンプレートとしてEX-TaqDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）で増幅した（アニール温度＝50℃、20サイクル）。増幅したPCR断片をEcoRI消化し、アガロースゲル電気泳動にて分画し約1kbpのDNA断片をジーンクリーンIIによって精製した。これをpGEX-4T-3発現ベクターのEcoRI部位へJM109コンピテントセル（東洋紡社製）を用いてサブクローニングした（pGST-PG1）。

2) 大腸菌BL21での発現

1) のサブクローンからプラスミドDNAを精製し、BL21大腸菌コンピテントセル（Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory出版）へ再導入した。BL21大腸菌は、東京大学理学部山本正幸教授より譲渡された。

3) GST融合グルカナーゼの精製

2) の大腸菌の一晩培養液4mlを100mg/mlのアンピシリンを含む2YT培地200mlへ移し、37℃で1.5時間培養した後、終濃度0.1mMとなるようにIPTG（宝酒造社製）を加え更に4時間培養を続けた。培養液より10,000rpm, 4℃, 10min遠心によって大腸菌を集め、遺伝子発現実験マニュアル（上記）に従い、グルタチオンセファロース（ファルマシア社製）を用いてグルタチオンSトランスフェラーゼ・グルカナーゼ融合蛋白質（分子量約62kDa）約1mgを精製した。

4) グルカナーゼ活性測定

精製されたグルタチオンSトランスフェラーゼ・グルカナーゼ融合蛋白質のグルカナーゼ活性を以下の方法に従い測定した。酵素反応溶液を37℃でインキュベートし、反応開始後0、10、20、30分後に反応を停止し、遊離されたグルコース量をネルソン[N. Nelson, J. Biol. Chem. (1944) 153, 375]の方法に従い定量した。酵素反応溶液は0.5ml、50mM酢酸緩衝液（pH5.5）、基質として2.5mgラミナリン、酵素としてグルタチオンSトランスフェラーゼ・グルカナーゼ融合蛋白質0.051 μ gないしは5.1 μ gで構成される。

その結果、第14図に示すとおり酵素濃度依存的かつ反応時間依存的にグルコースがラミナリンより遊離することから新規にクローニングされたcDNAがグルカナーゼ活性を保持することが明かにされた。このことから、配列番号4にコードされるダイズ由来のグルカナーゼと同様、植物のカビ抵抗性向上に利用できるものと思われる。

産業上の利用可能性

本発明により、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が導入されており、かつ、発現している植物及びその作出方法が提供された。

本発明の植物は、カビに対する高い抵抗性を有する。

配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 6 6 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val	Asn	Ile	Gln	Thr	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ile	Phe	Pro	Gln	Thr	Gln	Ser	Thr	Val
1				5					10					15			
Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Lys	Phe	Phe	Ser	Ser	Asn	Leu	Leu	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro
	20					25				30					35		
Thr	Asn	Ser	Phe	Phe	Gln	Asn	Phe	Val	Leu	Lys	Asn	Gly	Asp	Gln	Gln	Glu	Tyr
			40					45					50				
Ile	His	Pro	Tyr	Leu	Ile	Lys	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Pro
55					60				65						70		
Ser	Arg	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Ile	Phe	Gln	Val	Phe	Asn	Pro	Asp	Leu	Thr
		75					80				85					90	
Ile	Ser	Ala	Pro	Gln	Gly	Pro	Lys	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	His	Leu	Ile	Ser
				95					100					105			
Ser	Tyr	Ser	Asp	Leu	Ser	Val	Thr	Leu	Asp	Phe	Pro	Ser	Ser	Asn	Leu	Ser	Phe
	110						115				120				125		
Phe	Leu	Val	Arg	Gly	Ser	Pro	Tyr	Leu	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro
			130					135					140				
Leu	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	His	Ser	Ile	Leu	Ser	Phe	Ser	Ser	Asn	Asp	Ser	Asn
145					150				155					160			
Thr	Lys	Tyr	Thr	Phe	Gln	Phe	Asn	Asn	Gly	Gln	Thr	Trp	Leu	Leu	Tyr	Ala	Thr
	165						170					175				180	
Ser	Pro	Ile	Lys	Leu	Asn	His	Thr	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Ser	Asn	Ala	Phe	Ser
				185					190					195			

Gly Ile Ile Arg Ile Ala Leu Leu Pro Asp Ser Asp Ser Lys His Glu Ala Val
 200 205 210 215
 Leu Asp Lys Tyr Ser Ser Cys Tyr Pro Val Ser Gly Lys Ala Val Phe Arg Glu
 220 225 230
 Pro Phe Cys Val Glu Tyr Asn Trp Glu Lys Lys Asp Ser Gly Asp Leu Leu Leu
 235 240 245 250
 Leu Ala His Pro Leu His Val Gln Leu Leu Arg Asn Gly Asp Asn Asp Val Lys
 255 260 265 270
 Ile Leu Glu Asp Leu Lys Tyr Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val
 275 280 285
 Gly Asp Ser Trp Val Leu Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile
 290 295 300 305
 Lys Gly Ile Lys Glu Glu Ser His Asp Glu Ile Val Ser Ala Leu Ser Lys Asp
 310 315 320
 Val Glu Ser Leu Asp Ser Ser Ser Ile Thr Thr Thr Glu Ser Tyr Phe Tyr Gly
 325 330 335 340
 Lys Leu Ile Ala Arg Ala Ala Arg Leu Val Leu Ile Ala Glu Glu Leu Asn Tyr
 345 350 355 360
 Pro Asp Val Ile Pro Lys Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Thr Ile Glu Pro Trp
 365 370 375
 Leu Glu Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gly Phe Leu His Asp Glu Lys Trp Gly Gly
 380 385 390 395
 Ile Ile Thr Gln Lys Gly Ser Thr Asp Ala Gly Gly Asp Phe Gly Phe Gly Ile
 400 405 410
 Tyr Asn Asp His His Tyr His Leu Gly Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Ala Val Leu
 415 420 425 430
 Thr Lys Leu Asp Pro Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile
 435 440 445 450
 Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp Thr Lys Leu Asn Ser Asn Tyr Thr Arg Leu

	455		460		465
Arg Cys Phe Asp Pro Tyr Val Leu His Ser Trp Ala Gly Gly Leu Thr Glu Phe					
470		475		480	485
Thr Asp Gly Arg Asn Gln Glu Ser Thr Ser Glu Ala Val Ser Ala Tyr Tyr Ser					
	490		495		500
Ala Ala Leu Met Gly Leu Ala Tyr Gly Asp Ala Pro Leu Val Ala Leu Gly Ser					
505		510		515	520
Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ile Glu Gly Thr Lys Met Trp Trp His Val Lys Glu					
	525		530		535
Gly Gly Thr Leu Tyr Glu Lys Glu Phe Thr Gln Glu Asn Arg Val Met Gly Val					
	545		550		555
Leu Trp Ser Asn Lys Arg Asp Thr Gly Leu Trp Phe Ala Pro Ala Glu Trp Lys					
560		565		570	575
Glu Cys Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Leu Ala Pro Ile Ser Glu Ala Ile					
	580		585		590
Phe Ser Asn Val Asp Phe Val Lys Glu Leu Val Glu Trp Thr Leu Pro Ala Leu					
595		600		605	610
Asp Arg Glu Gly Gly Val Gly Glu Gly Trp Lys Gly Phe Val Tyr Ala Leu Glu					
	615		620		625
Gly Val Tyr Asp Asn Glu Ser Ala Leu Gln Lys Ile Arg Asn Leu Lys Gly Phe					
	635		640		645
Asp Gly Gly Asn Ser Leu Thr Asn Leu Leu Trp Trp Ile His Ser Arg Ser Asp					
650		655		660	665
Glu					
667					

配列番号 : 2

配列の長さ : 2 0 0 4

配列の型 : 核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ダイズ (*Glycine max* L.)

株名：グリーンホーマー

配列

9	18	27	36	45	54
GTT AAC ATC CAA ACC AAT ACA TCT TAC ATC TTC CCT CAA ACA CAA TCC ACT GTT					
Val Asn Ile Gln Thr Asn Thr Ser Tyr Ile Phe Pro Gln Thr Gln Ser Thr Val					
63	72	81	90	99	108
CTT CCT GAT CCC TCC AAA TTC TTC TCC TCA AAC CTT CTC TCA AGT CCA CTC CCC					
Leu Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Ser Asn Leu Leu Ser Ser Pro Leu Pro					
117	126	135	144	153	162
ACA AAC TCT TTC TTC CAA AAC TTT GTC CTA AAA AAT GGT GAC CAA CAA GAA TAC					
Thr Asn Ser Phe Phe Gln Asn Phe Val Leu Lys Asn Gly Asp Gln Gln Glu Tyr					
171	180	189	198	207	216
ATT CAT CCT TAC CTC ATC AAA TCC TCC AAC TCT TCC CTC TCT CTC TCA TAC CCT					
Ile His Pro Tyr Leu Ile Lys Ser Ser Asn Ser Ser Leu Ser Leu Ser Tyr Pro					
225	234	243	252	261	270
TCT CGC CAA GCC AGT TCA GCT GTC ATA TTC CAA GTC TTC AAT CCT GAT CTT ACC					
Ser Arg Gln Ala Ser Ser Ala Val Ile Phe Gln Val Phe Asn Pro Asp Leu Thr					
279	288	297	306	315	324
ATT TCA GCC CCA CAA GGT CCC AAA CAA GGT CCC CCT GGT AAA CAC CTT ATC TCC					
Ile Ser Ala Pro Gln Gly Pro Lys Gln Gly Pro Pro Gly Lys His Leu Ile Ser					
333	342	351	360	369	378
TCC TAC AGT GAT CTC AGT GTC ACC TTG GAT TTC CCT TCT TCC AAT CTG AGC TTC					
Ser Tyr Ser Asp Leu Ser Val Thr Leu Asp Phe Pro Ser Ser Asn Leu Ser Phe					
387	396	405	414	423	432

TTC CTT GTT AGG GGA AGC CCC TAT TTG ACT GTG TCT GTG ACT CAA CCA ACT CCT
 Phe Leu Val Arg Gly Ser Pro Tyr Leu Thr Val Ser Val Thr Gln Pro Thr Pro
 441 450 459 468 477 486
 CTT TCA ATT ACC ACC ATC CAT TCC ATT CTC TCA TTC TCT TCA AAT GAC TCC AAC
 Leu Ser Ile Thr Thr Ile His Ser Ile Leu Ser Phe Ser Ser Asn Asp Ser Asn
 495 504 513 522 531 540
 ACC AAG TAC ACC TTT CAG TTC AAC AAT GGT CAA ACA TGG CTT CTT TAT GCT ACC
 Thr Lys Tyr Thr Phe Gln Phe Asn Asn Gly Gln Thr Trp Leu Leu Tyr Ala Thr
 549 558 567 576 585 594
 TCC CCC ATC AAG TTG AAC CAC ACC CTT TCT GAG ATA ACT TCT AAT GCA TTT TCT
 Ser Pro Ile Lys Leu Asn His Thr Leu Ser Glu Ile Thr Ser Asn Ala Phe Ser
 603 612 621 630 639 648
 GGC ATA ATC CGG ATA GCT TTG TTG CCG GAT TCG GAT TCG AAA CAC GAG GCT GTT
 Gly Ile Ile Arg Ile Ala Leu Leu Pro Asp Ser Asp Ser Lys His Glu Ala Val
 657 666 675 684 693 702
 CTT GAC AAG TAT AGT TCT TGT TAC CCC GTG TCA GGT AAA GCT GTG TTC AGA GAA
 Leu Asp Lys Tyr Ser Ser Cys Tyr Pro Val Ser Gly Lys Ala Val Phe Arg Glu
 711 720 729 738 747 756
 CCT TTC TGT GTG GAA TAT AAC TGG GAG AAG AAA GAT TCA GGG GAT TTG CTA CTC
 Pro Phe Cys Val Glu Tyr Asn Trp Glu Lys Lys Asp Ser Gly Asp Leu Leu Leu
 765 774 783 792 801 810
 TTG GCT CAC CCT CTC CAT GTT CAG CTT CTT CGT AAT GGA GAC AAT GAT GTC AAA
 Leu Ala His Pro Leu His Val Gln Leu Leu Arg Asn Gly Asp Asn Asp Val Lys
 819 828 837 846 855 864
 ATT CTT GAA GAT TTA AAG TAT AAA AGC ATT GAT GGG GAT CTT GTT GGT GTT GTC
 Ile Leu Glu Asp Leu Lys Tyr Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val
 873 882 891 900 909 918
 GGG GAT TCA TGG GTT TTG AAA ACA GAT CCT TTG TTT GTA ACA TGG CAT TCA ATC
 Gly Asp Ser Trp Val Leu Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile

927	936	945	954	963	972
AAG GGA ATC AAA GAA GAA TCC CAT GAT GAG ATT GTC TCA GCC CTT TCT AAA GAT					
Lys Gly Ile Lys Glu Glu Ser His Asp Glu Ile Val Ser Ala Leu Ser Lys Asp					
981	990	999	1008	1017	1026
GTT GAG AGC CTA GAT TCA TCA TCA ATA ACT ACA ACA GAG TCA TAT TTT TAT GGG					
Val Glu Ser Leu Asp Ser Ser Ser Ile Thr Thr Thr Glu Ser Tyr Phe Tyr Gly					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
AAG TTG ATT GCA AGG GCT GCA AGG TTG GTA TTG ATT GCT GAG GAG TTG AAC TAC					
Lys Leu Ile Ala Arg Ala Ala Arg Leu Val Leu Ile Ala Glu Glu Leu Asn Tyr					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
CCT GAT GTG ATT CCA AAG GTT AGG AAT TTT TTG AAA GAA ACC ATT GAG CCA TGG					
Pro Asp Val Ile Pro Lys Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Thr Ile Glu Pro Trp					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
TTG GAG GGA ACT TTT AGT GGG AAT GGA TTC CTA CAT GAT GAA AAA TGG GGT GGC					
Leu Glu Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gly Phe Leu His Asp Glu Lys Trp Gly Gly					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
ATT ATT ACC CAA AAG GGG TCC ACT GAT GCT GGT GGT GAT TTT GGA TTT GGA ATT					
Ile Ile Thr Gln Lys Gly Ser Thr Asp Ala Gly Gly Asp Phe Gly Phe Gly Ile					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
TAC AAT GAT CAC CAC TAT CAT TTG GGG TAC TTC ATT TAT GGA ATT GCG GTG CTC					
Tyr Asn Asp His His Tyr His Leu Gly Tyr Phe Ile Tyr Gly Ile Ala Val Leu					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
ACT AAG CTT GAT CCA GCA TGG GGT AGG AAG TAC AAG CCT CAA GCC TAT TCA ATA					
Thr Lys Leu Asp Pro Ala Trp Gly Arg Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
GTG CAA GAC TTC TTG AAC TTG GAC ACA AAA TTA AAC TCC AAT TAC ACA CGT TTG					
Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp Thr Lys Leu Asn Ser Asn Tyr Thr Arg Leu					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
AGG TGT TTT GAC CCT TAT GTG CTT CAC TCT TGG GCT GGA GGG TTA ACT GAG TTC					

Arg	Cys	Phe	Asp	Pro	Tyr	Val	Leu	His	Ser	Trp	Ala	Gly	Gly	Leu	Thr	Glu	Phe
1467					1476			1485			1494			1503			1512
ACA	GAT	GGA	AGG	AAT	CAA	GAG	AGC	ACA	AGT	GAG	GCT	GTG	AGT	GCA	TAT	TAT	TCT
Thr	Asp	Gly	Arg	Asn	Gln	Glu	Ser	Thr	Ser	Glu	Ala	Val	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Ser
1521					1530			1539			1548			1557			1566
GCT	GCT	TTG	ATG	GGA	TTA	GCA	TAT	GGT	GAT	GCA	CCT	CTT	GTT	GCA	CTT	GGA	TCA
Ala	Ala	Leu	Met	Gly	Leu	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ser
1575					1584			1593			1602			1611			1620
ACA	CTC	ACA	GCA	TTG	GAA	ATT	GAA	GGG	ACT	AAA	ATG	TGG	TGG	CAT	GTG	AAA	GAG
Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Gly	Thr	Lys	Met	Trp	Trp	His	Val	Lys	Glu
1629					1638			1647			1656			1665			1674
GGA	GGT	ACT	TTG	TAT	GAG	AAA	GAG	TTT	ACA	CAA	GAG	AAT	AGG	GTG	ATG	GGT	GTT
Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Glu	Lys	Glu	Phe	Thr	Gln	Glu	Asn	Arg	Val	Met	Gly	Val
1683					1692			1701			1710			1719			1728
CTA	TGG	TCT	AAC	AAG	AGG	GAC	ACT	GGA	CTT	TGG	TTT	GCT	CCT	GCT	GAG	TGG	AAA
Leu	Trp	Ser	Asn	Lys	Arg	Asp	Thr	Gly	Leu	Trp	Phe	Ala	Pro	Ala	Glu	Trp	Lys
1737					1746			1755			1764			1773			1782
GAG	TGT	AGG	CTT	GGC	ATT	CAG	CTC	TTA	CCA	TTG	GCT	CCT	ATT	TCT	GAA	GCC	ATT
Glu	Cys	Arg	Leu	Gly	Ile	Gln	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Pro	Ile	Ser	Glu	Ala	Ile
1791					1800			1809			1818			1827			1836
TTC	TCC	AAT	GTT	GAC	TTT	GTA	AAG	GAG	CTT	GTG	GAG	TGG	ACT	TTG	CCT	GCT	TTG
Phe	Ser	Asn	Val	Asp	Phe	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Glu	Trp	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu
1845					1854			1863			1872			1881			1890
GAT	AGG	GAG	GGT	GGT	GTT	GGT	GAA	GGA	TGG	AAG	GGG	TTT	GTG	TAT	GCC	CTT	GAA
Asp	Arg	Glu	Gly	Gly	Val	Gly	Glu	Gly	Trp	Lys	Gly	Phe	Val	Tyr	Ala	Leu	Glu
1899					1908			1917			1926			1935			1944
GGG	GTT	TAT	GAC	AAT	GAA	AGT	GCA	CTG	CAG	AAG	ATA	AGA	AAC	CTG	AAA	GGT	TTT
Gly	Val	Tyr	Asp	Asn	Glu	Ser	Ala	Leu	Gln	Lys	Ile	Arg	Asn	Leu	Lys	Gly	Phe
1953					1962			1971			1980			1989			1998

GAT GGT GGA AAC TCT TTG ACC AAT CTC TTG TGG TGG ATT CAT AGC AGA AGT GAT
Asp Gly Gly Asn Ser Leu Thr Asn Leu Leu Trp Trp Ile His Ser Arg Ser Asp

2004

GAA TAG

Glu

配列番号 : 3

配列の長さ : 347

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met	Ala	Lys	Tyr	His	Ser	Ser	Gly	Lys	Ser	Ser	Ser	Met	Thr	Ala	Ile	Ala	Phe
1				5					10					15			
Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Gly	Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Ser	Gly	Val
	20				25					30					35		
Cys	Tyr	Gly	Arg	Leu	Gly	Asn	Asn	Leu	Pro	Thr	Pro	Gln	Glu	Val	Val	Ala	Leu
			40					45					50				
Tyr	Asn	Gln	Ala	Asn	Ile	Arg	Arg	Met	Arg	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ser	Pro	Glu	Val
	55				60					65					70		
Leu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Asn	Ile	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Ile	Pro	Asn	Asp
		75					80					85				90	
Asn	Leu	Arg	Asn	Leu	Ala	Ser	Ser	Gln	Asp	Asn	Ala	Asn	Lys	Trp	Val	Gln	Asp
				95					100				105				
Asn	Ile	Lys	Asn	Tyr	Ala	Asn	Asn	Val	Arg	Phe	Arg	Tyr	Val	Ser	Val	Gly	Asn
	110					115					120				125		
Glu	Val	Lys	Pro	Glu	His	Ser	Phe	Ala	Gln	Phe	Leu	Val	Pro	Ala	Leu	Glu	Asn
			130					135					140				
Ile	Gln	Arg	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Val	Lys	Val	Ser	Thr

145	150	155	160
Ala Ile Asp Thr Gly Ala Leu Ala Glu Ser Phe Pro Pro Ser Lys Gly Ser Phe			
165	170	175	180
Lys Ser Asp Tyr Arg Gly Ala Tyr Leu Asp Gly Val Ile Arg Phe Leu Val Asn			
185	190	195	
Asn Asn Ala Pro Leu Met Val Asn Val Tyr Ser Tyr Phe Ala Tyr Thr Ala Asn			
200	205	210	215
Pro Lys Asp Ile Ser Leu Asp Tyr Ala Leu Phe Arg Ser Pro Ser Val Val Val			
220	225	230	
Gln Asp Gly Ser Leu Gly Tyr Arg Asn Leu Phe Asp Ala Ser Val Asp Ala Val			
235	240	245	250
Tyr Ala Ala Leu Glu Lys Ala Gly Gly Gly Ser Leu Asn Ile Val Val Ser Glu			
255	260	265	270
Ser Gly Trp Pro Ser Ser Gly Gly Thr Ala Thr Ser Leu Asp Asn Ala Arg Thr			
275	280	285	
Tyr Asn Thr Asn Leu Val Arg Asn Val Lys Gln Gly Thr Pro Lys Arg Pro Gly			
290	295	300	305
Ala Pro Leu Glu Thr Tyr Val Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn Gln Lys Gln Pro			
310	315	320	
Glu Phe Glu Lys Phe Trp Gly Leu Phe Ser Pro Ile Thr Lys Gln Pro Lys Tyr			
325	330	335	340
Ser Ile Asn Phe Asn			
345	347		

配列番号 : 4

配列の長さ : 1044

配列の型 : 核酸

配列

9

18

27

36

45

54

5 2

ATG	GCT	AAG	TAT	CAT	TCA	AGT	GGG	AAA	AGC	TCT	TCC	ATG	ACT	GCT	ATA	GCC	TTC
Met	Ala	Lys	Tyr	His	Ser	Ser	Gly	Lys	Ser	Ser	Ser	Met	Thr	Ala	Ile	Ala	Phe
63					72			81			90			99			108
CTG	TTT	ATC	CTT	CTA	ATC	ACT	TAT	ACA	GGC	ACA	ACA	GAT	GCA	CAA	TCC	GGG	GTA
Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Gly	Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Ser	Gly	Val
117					126			135			144			153			162
TGT	TAT	GGA	AGA	CTT	GGC	AAC	AAC	TTA	CCA	ACC	CCT	CAA	GAA	GTT	GTG	GCC	CTC
Cys	Tyr	Gly	Arg	Leu	Gly	Asn	Asn	Leu	Pro	Thr	Pro	Gln	Glu	Val	Val	Ala	Leu
171					180			189			198			207			216
TAC	AAT	CAA	GCC	AAC	ATT	CGC	AGG	ATG	CGA	ATC	TAC	GGT	CCA	AGC	CCA	GAA	GTC
Tyr	Asn	Gln	Ala	Asn	Ile	Arg	Arg	Met	Arg	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ser	Pro	Glu	Val
225					234			243			252			261			270
CTC	GAA	GCA	CTA	AGA	GGT	TCC	AAC	ATT	GAG	CTT	TTG	CTA	GAC	ATT	CCA	AAT	GAC
Leu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Asn	Ile	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Ile	Pro	Asn	Asp
279					288			297			306			315			324
AAC	CTC	AGA	AAC	CTA	GCA	TCT	AGC	CAA	GAC	AAT	GCA	AAC	AAA	TGG	GTG	CAA	GAC
Asn	Leu	Arg	Asn	Leu	Ala	Ser	Ser	Gln	Asp	Asn	Ala	Asn	Lys	Trp	Val	Gln	Asp
333					342			351			360			369			378
AAC	ATC	AAA	AAC	TAT	GCC	AAC	AAT	GTC	AGA	TTC	AGA	TAC	GTT	TCA	GTG	GGA	AAT
Asn	Ile	Lys	Asn	Tyr	Ala	Asn	Asn	Val	Arg	Phe	Arg	Tyr	Val	Ser	Val	Gly	Asn
387					396			405			414			423			432
GAA	GTG	AAA	CCC	GAA	CAC	TCA	TTT	GCA	CAA	TTT	CTA	GTG	CCT	GCA	TTG	GAA	AAC
Glu	Val	Lys	Pro	Glu	His	Ser	Phe	Ala	Gln	Phe	Leu	Val	Pro	Ala	Leu	Glu	Asn
441					450			459			468			477			486
ATT	CAG	AGG	GCC	ATT	TCT	AAT	GCT	GGC	CTT	GGA	AAC	CAA	GTA	AAA	GTT	TCC	ACT
Ile	Gln	Arg	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Val	Lys	Val	Ser	Thr
495					504			513			522			531			540
GCC	ATT	GAT	ACT	GGT	GCC	TTG	GCA	GAA	TCA	TTC	CCA	CCA	TCA	AAG	GGT	TCC	TTC
Ala	Ile	Asp	Thr	Gly	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Phe	Pro	Pro	Ser	Lys	Gly	Ser	Phe

549	558	567	576	585	594
AAA TCT GAT TAT AGA GGA GCA TAT CTT GAT GGT GTC ATC AGA TTT CTA GTG AAC					
Lys Ser Asp Tyr Arg Gly Ala Tyr Leu Asp Gly Val Ile Arg Phe Leu Val Asn					
603	612	621	630	639	648
AAT AAT GCC CCA TTA ATG GTT AAT GTG TAC TCT TAC TTC GCT TAC ACT GCA AAC					
Asn Asn Ala Pro Leu Met Val Asn Val Tyr Ser Tyr Phe Ala Tyr Thr Ala Asn					
657	666	675	684	693	702
CCT AAG GAC ATT AGT CTT GAC TAT GCA CTT TTT AGG TCT CCT TCG GTG GTA GTG					
Pro Lys Asp Ile Ser Leu Asp Tyr Ala Leu Phe Arg Ser Pro Ser Val Val Val					
711	720	729	738	747	756
CAA GAT GGT TCA CTT GGT TAC CGT AAC CTC TTT GAT GCT TCG GTT GAT GCT GTT					
Gln Asp Gly Ser Leu Gly Tyr Arg Asn Leu Phe Asp Ala Ser Val Asp Ala Val					
765	774	783	792	801	810
TAT GCT GCA TTG GAG AAA GCA GGA GGA GGG TCA TTG AAC ATA GTT GTG TCT GAG					
Tyr Ala Ala Leu Glu Lys Ala Gly Gly Gly Ser Leu Asn Ile Val Val Ser Glu					
819	828	837	846	855	864
AGT GGA TGG CCT TCT TCT GGT GGA ACT GCA ACT TCA CTT GAT AAT GCA AGA ACT					
Ser Gly Trp Pro Ser Ser Gly Gly Thr Ala Thr Ser Leu Asp Asn Ala Arg Thr					
873	882	891	900	909	918
TAC AAC ACA AAC TTG GTT CGG AAT GTG AAG CAA GGA ACC CCT AAA AGG CCT GGT					
Tyr Asn Thr Asn Leu Val Arg Asn Val Lys Gln Gly Thr Pro Lys Arg Pro Gly					
927	936	945	954	963	972
GCA CCC CTT GAA ACT TAT GTG TTT GCC ATG TTT GAT GAA AAT CAG AAG CAG CCA					
Ala Pro Leu Glu Thr Tyr Val Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn Gln Lys Gln Pro					
981	990	999	1008	1017	1026
GAG TTT GAA AAA TTT TGG GGG CTC TTT TCT CCT ATA ACT AAG CAG CCC AAA TAC					
Glu Phe Glu Lys Phe Trp Gly Leu Phe Ser Pro Ile Thr Lys Gln Pro Lys Tyr					
1035	1044				
TCG ATT AAT TTC AAT TAA					

Ser Ile Asn Phe Asn

配列番号 : 5

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Val Asn Ile Gln Thr Asn Thr Ser Asn Ile Ser Pro Gln

1 5 10 13

配列番号 : 6

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Val Gly Val Val Gly Asp Ser

1 5 10 14

配列番号 : 7

配列の長さ : 17

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Tyr Ser Ile Val Gln Asp Phe Leu Asn Leu Asp

1 5 10 15 17

配列番号 : 8

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Thr Asp Pro Leu Phe Val Thr Trp His Ser Ile Lys

1

5

10

13

配列番号 : 9

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AARAGYATHG AYGGNGA

17

配列番号 : 10

配列の長さ : 13

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

WRTCNCNAC NAC

13

配列番号 : 11

配列の長さ : 17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTNAAYAARA TNCARAC

17

配列番号：1 2

配列の長さ：1 7

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ARRTTNAGRA ARTCYTC

17

配列番号：1 3

配列の長さ：2 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAGTAYAAGC CRCAAGCCTA TTCA

24

配列番号：1 4

配列の長さ：1 7

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATCGCCRACA ACMCCAA

17

配列番号：1 5

配列の長さ：5 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGAATTCGAG CTCGGTACCC GGGGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGGCA TGCA

配列番号：1 6

配列の長さ：5 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTTAAGCTC GAGCCATGGG CCCCCTAGGA GATCTCAGCT GGACGTCCGT ACGTTCGA

配列番号：1 7

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGGATCCAT GGTTAACATC CAAACC

26

配列番号：1 8

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGGATCCGA ATATAACTGG GAGAAG

26

配列番号：1 9

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGGATCCCC AGCATGGGGT AGGAAG

26

配列番号：2 0

配列の長さ：2 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAGTCGACTA CTTCTCCCAG TTATATTC

28

配列番号：2 1

配列の長さ：2 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAGTCGACTA CTCCTACCC CATGCTGG

28

配列番号：2 2

配列の長さ：2 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAGTCGACTA TTCATCACTT CTGCTATG

28

配列番号：2 3

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGGATCCGC CCCACAAGGT CCCAAA

26

配列番号：2 4

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGGATCCAA TGA CTCCAAC ACCAAG

26

配列番号：25

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGGATCCGA ATATAACTGG GAGAAG

26

配列番号：26

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TAGTCGACTA CTCCTACCC CATGCTGG

28

配列番号：27

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTAGAGGATC CGGTACCCCC GGGGTCGACG AGCT

34

配列番号：2 8

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGTCGACCCC GGGGGTACCG GATCCT

26

配列番号：2 9

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACCTTCAGC AACAAATGGTT

20

配列番号：3 0

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTATTCATCA CTTCTGCTAT

20

配列番号：3 1

配列の長さ：2 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAAATGTTGT GGTGAGGGAT GGCC

24

配列番号：3 2

配列の長さ：2 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAATGTTTCT CTATCTCAGG ACTC

24

配列番号：3 3

配列の長さ：9 9 6

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：インゲン

株名：平莢ファンシー菜豆

配列

9	18	27	36	45	54
ATG TCT GCC TTA TTG CTG CTT CTT GGA GTA TTA TCT TCC ACT GGA GTA CTG CTT					
Met Ser Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ser Ser Thr Gly Val Leu Leu					
63	72	81	90	99	108
ACT GGG GTA GAA TCT GTG GGT GTG TGT TAT GGA GGA AAT GGA AAC AAT CTA CCA					
Thr Gly Val Glu Ser Val Gly Val Cys Tyr Gly Gly Asn Gly Asn Asn Leu Pro					
117	126	135	144	153	162
ACA AAG CAA GCA GTG GTG AAT CTC TAC AAA TCA AAC GGA ATT GGC AAA ATC CGT					
Thr Lys Gln Ala Val Val Asn Leu Tyr Lys Ser Asn Gly Ile Gly Lys Ile Arg					
171	180	189	198	207	216
TTA TAC TAT CCA GAT GAA GGT GCC CTT CAA GCC CTC AGA GGT TCA AAC ATA GAA					
Leu Tyr Tyr Pro Asp Glu Gly Ala Leu Gln Ala Leu Arg Gly Ser Asn Ile Glu					
225	234	243	252	261	270
GTG ATA CTT GCT GTT CCT AAT GAT CAA CTT CAA TCT GTC TCC AAC AAT GGA AGT					
Val Ile Leu Ala Val Pro Asn Asp Gln Leu Gln Ser Val Ser Asn Asn Gly Ser					
279	288	297	306	315	324
GCA ACA AAT TGG GTC AAC AAT TAC GTG AAA CCC TAT GCA GGA AAC GTG AAA TTG					
Ala Thr Asn Trp Val Asn Asn Tyr Val Lys Pro Tyr Ala Gly Asn Val Lys Leu					
333	342	351	360	369	378
AAG TAC ATT GCA GTT GGC AAC GAA GTT CAC CCT GGT GAT GCT CTA GCA GGC TCA					
Lys Tyr Ile Ala Val Gly Asn Glu Val His Pro Gly Asp Ala Leu Ala Gly Ser					
387	396	405	414	423	432
GTT CTT CCA GCA CTT CAA AGC ATT CAG AAC GCA ATT TCT GCA GCA AAT TTG CAA					
Val Leu Pro Ala Leu Gln Ser Ile Gln Asn Ala Ile Ser Ala Ala Asn Leu Gln					
441	450	459	468	477	486
CGC CAA ATC AAA GTC TCC ACA GCA ATA GAC ACC ACT CTA CTG GGC AAC TCT TAC					

Arg	Gln	Ile	Lys	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Thr	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	Tyr
	495				504			513			522			531			540
CCA	CCA	AAA	GAT	GGC	GTT	TTC	AGC	AAC	AGT	GCA	AGT	TCA	TAC	ATA	ACT	CCA	ATC
Pro	Pro	Lys	Asp	Gly	Val	Phe	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	Ser	Tyr	Ile	Thr	Pro	Ile
	549				558			567			576			585			594
ATA	AAC	TTT	TTA	GCC	AAA	AAC	GGT	GCC	CCA	CTT	CTT	GCA	AAC	GTG	TAC	CCT	TAC
Ile	Asn	Phe	Leu	Ala	Lys	Asn	Gly	Ala	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	Pro	Tyr
	603				612			621			630			639			648
TTC	GCC	TAC	GTT	AAC	AAT	CAA	CAA	AAC	ATT	GGT	CTT	GAT	TAT	GCC	TTG	TTT	ACC
Phe	Ala	Tyr	Val	Asn	Asn	Gln	Gln	Asn	Ile	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ala	Leu	Phe	Thr
	657				666			675			684			693			702
AAA	CAA	GGC	AAC	AAC	GAA	GTT	GGG	TAC	CAA	AAC	CTG	TTT	GAT	GCA	TTG	GTG	GAT
Lys	Gln	Gly	Asn	Asn	Glu	Val	Gly	Tyr	Gln	Asn	Leu	Phe	Asp	Ala	Leu	Val	Asp
	711				720			729			738			747			756
TCT	CTG	TAC	GCA	GCT	CTT	GAG	AAA	GTG	GGA	GCA	TCA	AAT	GTG	AAG	GTT	GTT	GTG
Ser	Leu	Tyr	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Val	Lys	Val	Val	Val
	765				774			783			792			801			810
TCT	GAG	AGT	GGG	TGG	CCA	TCA	CAA	GGT	GGA	GTT	GGA	GCC	ACT	GTT	CAA	AAC	GCA
Ser	Glu	Ser	Gly	Trp	Pro	Ser	Gln	Gly	Gly	Val	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Asn	Ala
	819				828			837			846			855			864
GGA	ACG	TAT	TAC	AGG	AAT	TTG	ATC	AAA	CAT	GTT	AAG	GGT	GGC	ACC	CCA	AAG	AGG
Gly	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asn	Leu	Ile	Lys	His	Val	Lys	Gly	Gly	Thr	Pro	Lys	Arg
	873				882			891			900			909			918
CCT	AAT	GGA	CCC	ATA	GAG	ACT	TAC	CTC	TTT	GCC	ATG	TTT	GAT	GAA	AAC	CAG	AAG
Pro	Asn	Gly	Pro	Ile	Glu	Thr	Tyr	Leu	Phe	Ala	Met	Phe	Asp	Glu	Asn	Gln	Lys
	927				936			945			954			963			972
GGT	GGT	GCA	GAA	ACT	GAG	AAA	CAC	TTT	GGT	CTC	TTC	AGG	CCT	GAT	AAA	TCA	CCA
Gly	Gly	Ala	Glu	Thr	Glu	Lys	His	Phe	Gly	Leu	Phe	Arg	Pro	Asp	Lys	Ser	Pro
	981				990			996									

AAA TAC CAA CTC AGT TTC AAT TGA

Lys Tyr Gln Leu Ser Phe Asn***

配列番号 : 3 4

配列の長さ : 3 3 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Val	Leu	Ser	Ser	Thr	Gly	Val	Leu	Leu
1				5					10						15		
Thr	Gly	Val	Glu	Ser	Val	Gly	Val	Cys	Tyr	Gly	Gly	Asn	Gly	Asn	Asn	Leu	Pro
	20					25					30					35	
Thr	Lys	Gln	Ala	Val	Val	Asn	Leu	Tyr	Lys	Ser	Asn	Gly	Ile	Gly	Lys	Ile	Arg
		40					45						50				
Leu	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Glu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Asn	Ile	Glu
55				60					65						70		
Val	Ile	Leu	Ala	Val	Pro	Asn	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asn	Gly	Ser
	75						80					85				90	
Ala	Thr	Asn	Trp	Val	Asn	Asn	Tyr	Val	Lys	Pro	Tyr	Ala	Gly	Asn	Val	Lys	Leu
		95						100					105				
Lys	Tyr	Ile	Ala	Val	Gly	Asn	Glu	Val	His	Pro	Gly	Asp	Ala	Leu	Ala	Gly	Ser
	110					115					120				125		
Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Gln	Ser	Ile	Gln	Asn	Ala	Ile	Ser	Ala	Ala	Asn	Leu	Gln
		130						135					140				
Arg	Gln	Ile	Lys	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Thr	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	Tyr
145				150					155					160			
Pro	Pro	Lys	Asp	Gly	Val	Phe	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	Ser	Tyr	Ile	Thr	Pro	Ile
	165							170					175			180	

Ile Asn Phe Leu Ala Lys Asn Gly Ala Pro Leu Leu Ala Asn Val Tyr Pro Tyr
 185 190 195
 Phe Ala Tyr Val Asn Asn Gln Gln Asn Ile Gly Leu Asp Tyr Ala Leu Phe Thr
 200 205 210 215
 Lys Gln Gly Asn Asn Glu Val Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Leu Val Asp
 220 225 230
 Ser Leu Tyr Ala Ala Leu Glu Lys Val Gly Ala Ser Asn Val Lys Val Val Val
 235 240 245 250
 Ser Glu Ser Gly Trp Pro Ser Gln Gly Gly Val Gly Ala Thr Val Gln Asn Ala
 255 260 265 270
 Gly Thr Tyr Tyr Arg Asn Leu Ile Lys His Val Lys Gly Gly Thr Pro Lys Arg
 275 280 285
 Pro Asn Gly Pro Ile Glu Thr Tyr Leu Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn Gln Lys
 290 295 300 305
 Gly Gly Ala Glu Thr Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Arg Pro Asp Lys Ser Pro
 310 315 320
 Lys Tyr Gln Leu Ser Phe Asn***
 325 330

配列番号 : 3 5

配列の長さ : 2 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GGAATTCCGA ATCTGTGGGT GTGTGTTAT

29

配列番号 : 3 6

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGAAACAGCT ATGACCATGA TTAGC

25

請 求 の 範 囲

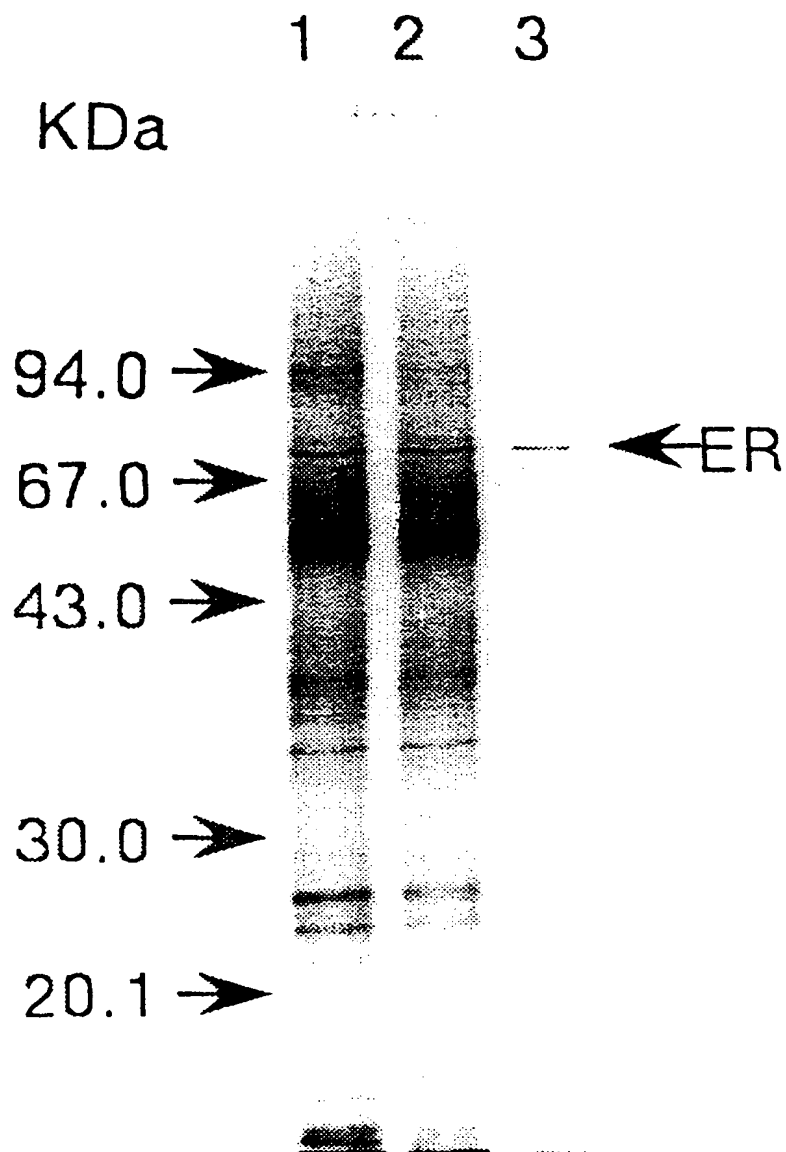
1. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を植物染色体中に組込んで発現させることにより、病原性のカビに対して抵抗性を持つ植物を作出する方法。
2. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである、請求の範囲第1項記載の方法。
3. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が実質的に配列表の配列番号2に示した塩基配列を含むものである、請求の範囲第1項記載の方法。
4. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列がプラスミド p E R 2 3-1 に組み込まれた塩基配列を含むものである、請求の範囲第1項記載の方法。
5. さらにグルカナーゼをコードするDNA配列を植物染色体中に組込んで発現させることを含む、請求の範囲第1項記載の方法。
6. グルカナーゼをコードするDNA配列が実質的に配列表の配列番号3または34に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである、請求の範囲第5項記載の方法。
7. グルカナーゼをコードするDNA配列が実質的に配列表の配列番号4または33に示した塩基配列を含むものである、請求の範囲第5項記載の方法。
8. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列をアグロバクテリウムに導入した後、該アグロバクテリウムを植物に感染させることにより、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を植物染色体中に組込む、請求の範囲第1項記載の方法。
9. 葉、茎、根、塊茎、プロトプラスト、カルス、種子胚、苗条原基および花粉から成る群より選択された植物材料にグルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を導入する、請求の範囲第1項記載の方法。
10. 葉、茎、根、塊茎、プロトプラスト、カルス、種子胚、苗条原基および花粉から成る群より選択された植物材料にグルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列を導入した後、該植物材料から植物を再分化させる、請求の範囲第9項記載の方法。

11. 病原性のカビが、細胞壁成分にグルカンを含むものである、請求の範囲第1項記載の方法。
12. 病原性のカビが、*Phthophthora* 属または*Rhizoctonia* 属に属するものである、請求の範囲第1項記載の方法。
13. 植物が、細胞壁成分にグルカンを含む病原性のカビが感染するものである、請求の範囲第1項記載の方法。
14. 植物が、ナス科植物またはマメ科植物に属するものである、請求の範囲第1項記載の方法。
15. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が導入されており、かつ、発現している、病原性のカビに対して抵抗性を持つ植物またはその子孫。
16. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである、請求の範囲第15項記載の植物またはその子孫。
17. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列が実質的に配列表の配列番号2に示した塩基配列を含むものである、請求の範囲第15項記載の植物またはその子孫。
18. グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列がプラスミド p E R 2 3 - 1 に組み込まれた塩基配列を含むものである、請求の範囲第15項記載の植物またはその子孫。
19. さらにグルカナーゼをコードするDNA配列が導入されており、かつ、発現している、請求の範囲第15項記載の植物またはその子孫。
20. グルカナーゼをコードするDNA配列が実質的に配列表の配列番号3または34に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである、請求の範囲第19項記載の植物またはその子孫。
21. グルカナーゼをコードするDNA配列が実質的に配列表の配列番号4または33に示した塩基配列を含むものである、請求の範囲第19項記載の植物またはその子孫。
22. 病原性のカビが、細胞壁成分にグルカンを含むものである、請求の範囲第15項記載の植物またはその子孫。

23. 病原性のカビが、*Phytophthora* 属または*Rhizoctonia* 属に属するものである、請求の範囲第15項記載の植物またはその子孫。
24. 植物が、細胞壁成分にグルカンを含む病原性のカビが感染するものである、請求の範囲第15項記載の植物またはその子孫。
25. 植物が、ナス科植物またはマメ科植物に属するものである、請求の範囲第15項記載の植物またはその子孫。
26. 病原性のカビに対する抵抗性を植物に付与するか、あるいは病原性のカビに対する植物の抵抗性を増強させるための、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列の使用。
27. 病原性のカビに対して抵抗性を持つ植物を作出するための、グルカンエリシターレセプターをコードするDNA配列の使用。

第 1 図

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動



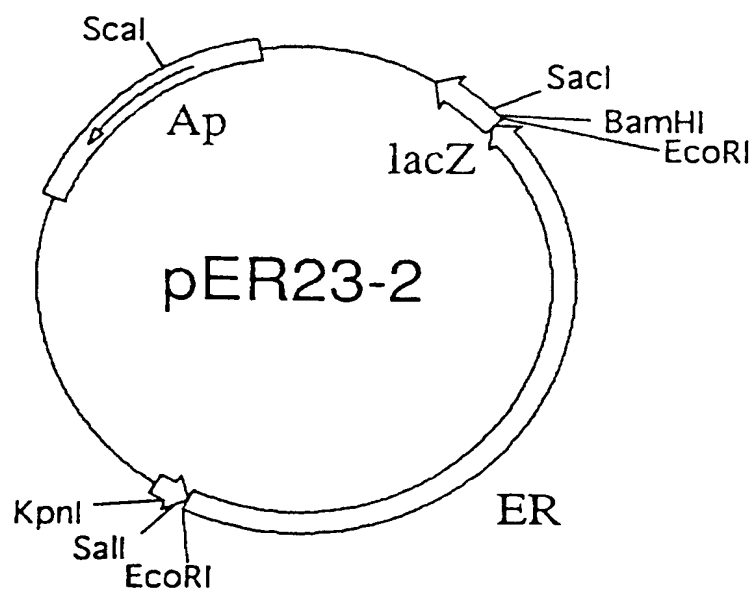
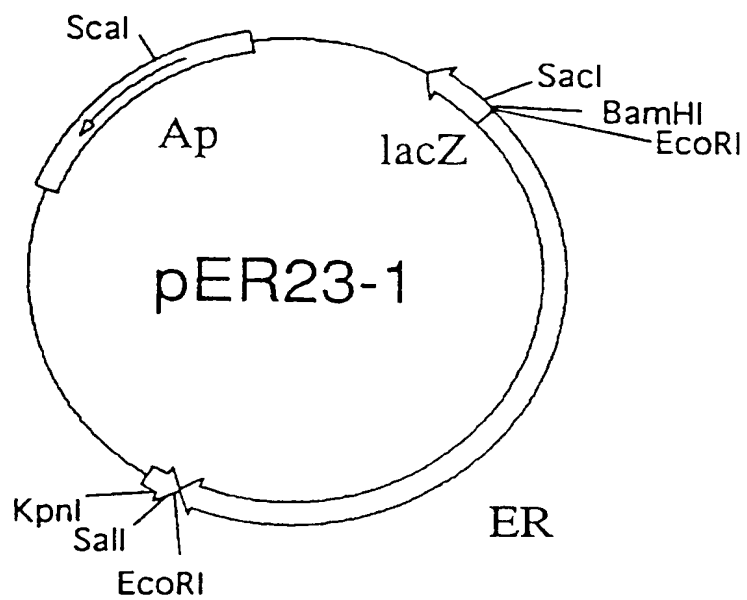
1 : Mono Q

2 : マルトース結合ガラスゲル素通り画分

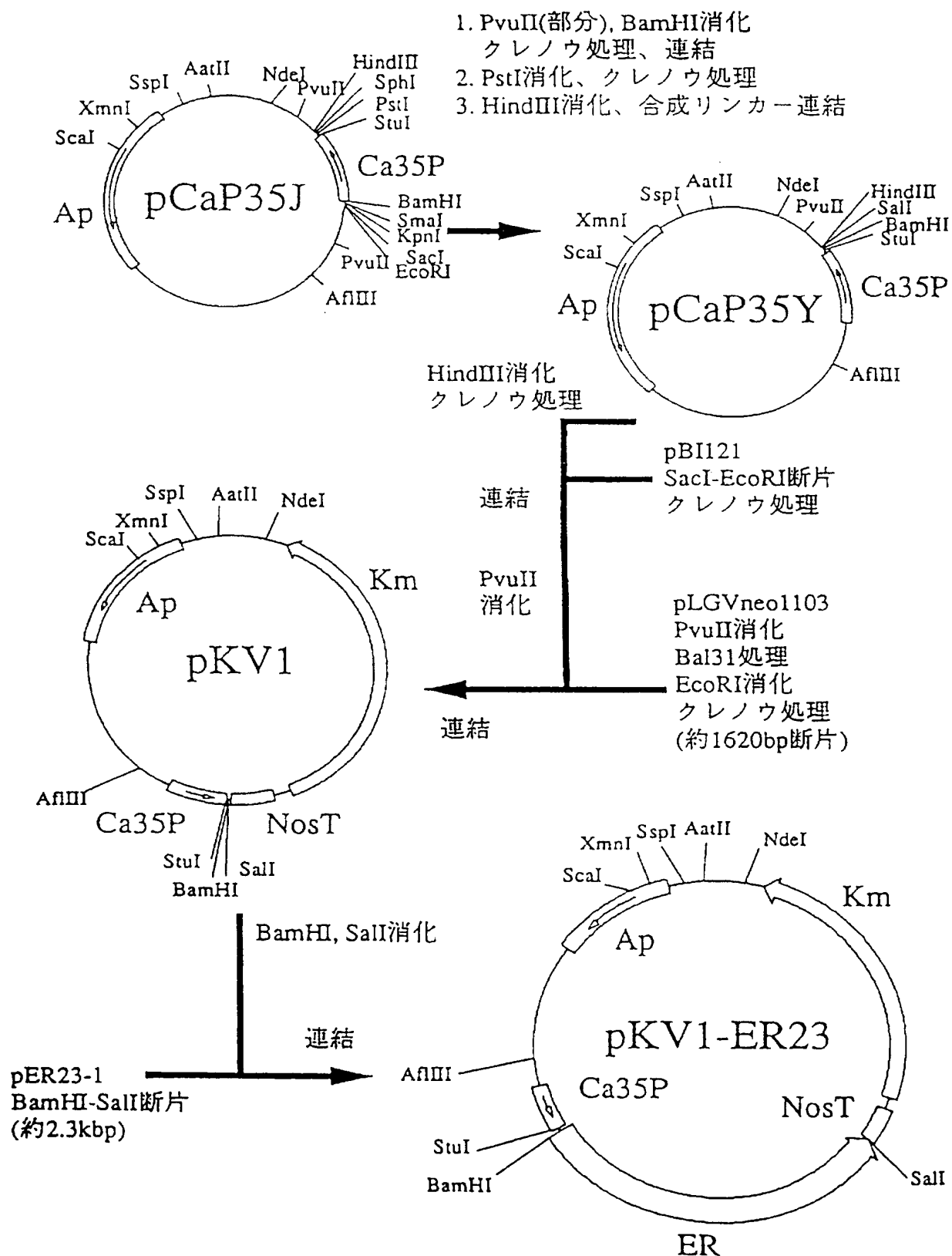
3 : エリシター結合ガラスゲル溶出画分

ER : エリシターレセプター

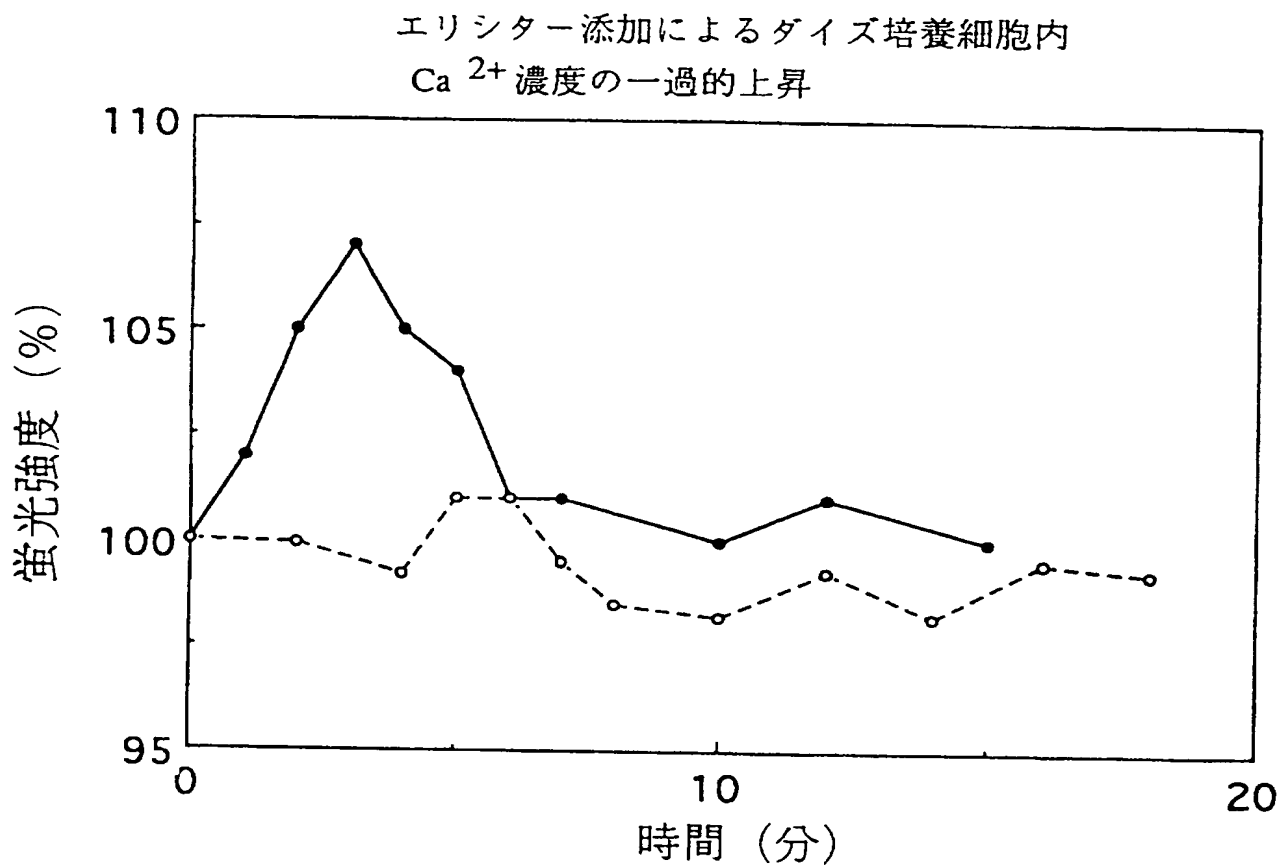
第 2 図



第 3 図



第 4 図



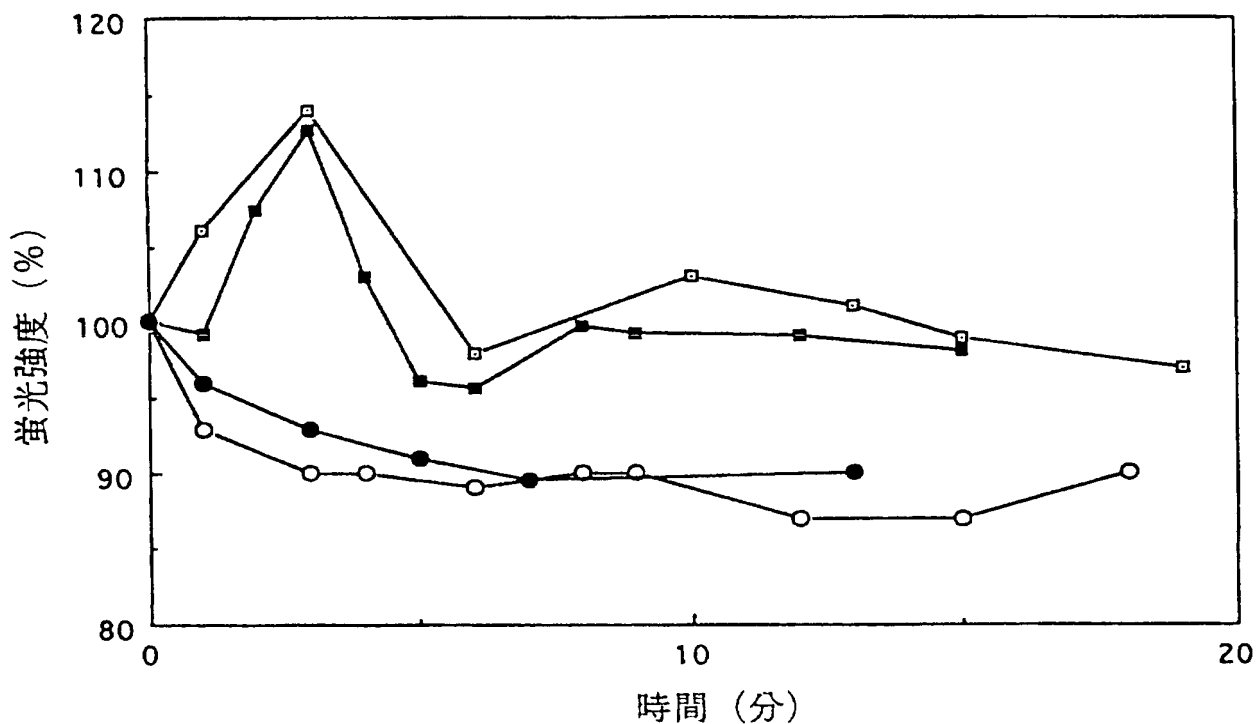
蛍光強度 (%) : (サンプル添加後の蛍光強度 / サンプル添加前の蛍光強度) X 100

—●— : ダイズ培養細胞にエリシターを添加

---○--- : ダイズ培養細胞に脱イオン水を添加

第 5 図

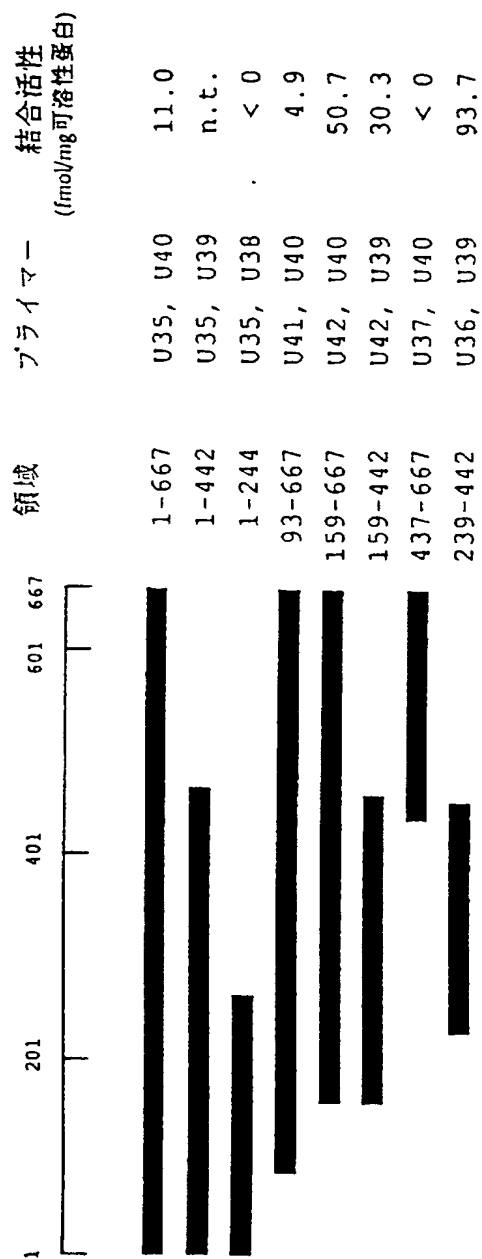
エリシター添加による形質転換タバコ培養細胞内
Ca²⁺ 濃度の一過的上昇



蛍光強度 (%) : (サンプル添加後の蛍光強度 / サンプル添加前の蛍光強度) X 100

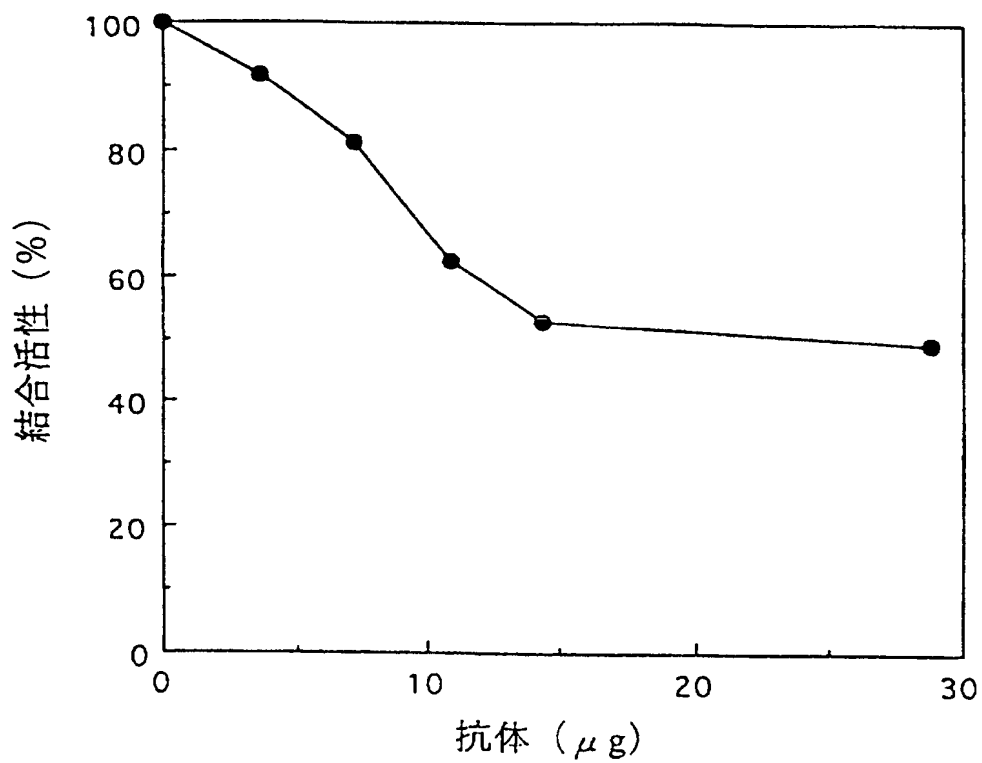
- : エリシター添加、形質転換タバコ培養細胞
- : エリシター添加、形質転換タバコ培養細胞
- : 脱イオン水添加、形質転換タバコ培養細胞
- : エリシター添加、プラスミド導入タバコ培養細胞

第 6 図



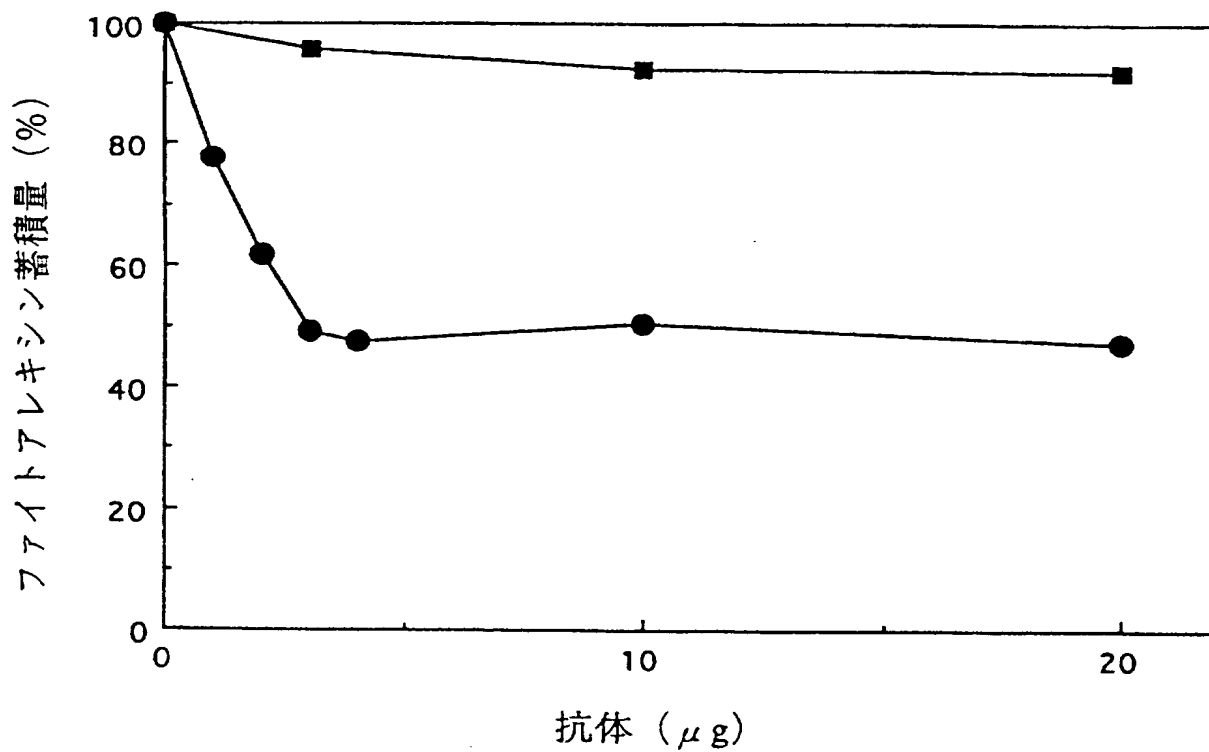
第 7 図

抗体によるエリシターと膜画分との結合阻害



第 8 図

抗体によるエリシターのファイトアレキシン蓄積阻害

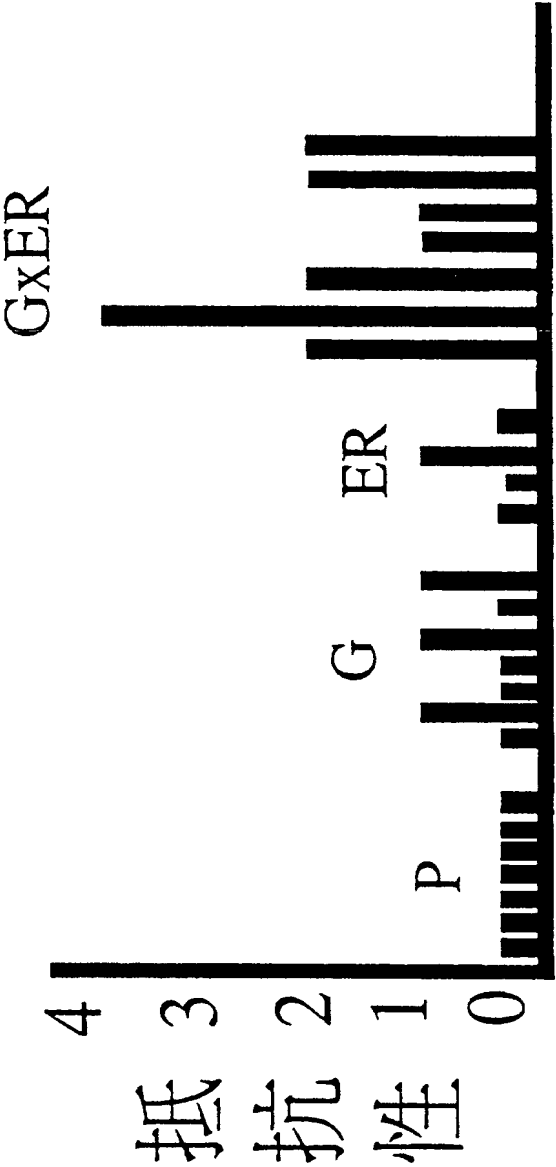


—■— : 酵母由来のpac Iに対する抗体を添加

—●— : エリシター結合ドメインに対する抗体を添加

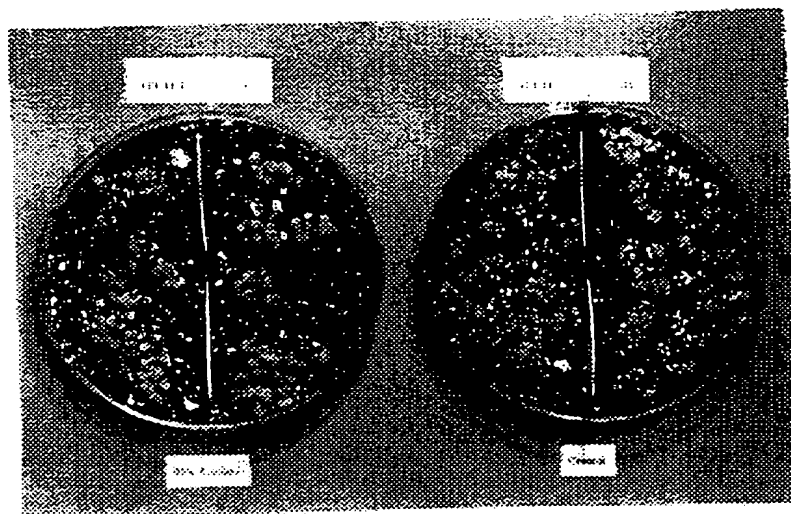
第9図

タバコ疫病菌 (*P. nicotiana*) に対する抵抗性



P: pBI121形質転換タバコ (コントロール)
G: ゲルカナナーゼ発現タバコ
ER: ER発現タバコ
GxER: ゲルカナナーゼ、ER共発現タバコ

第 1 0 図

タバコ腰折病菌 (*R. solani*) に対する抵抗性

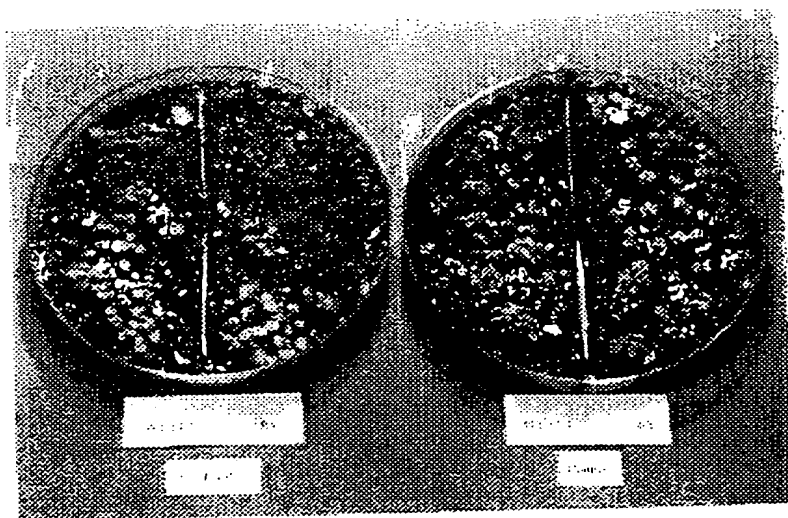
ER BY

+タバコ腰折病菌

ER BY

-タバコ腰折病菌

(播種58日目)



ER BY

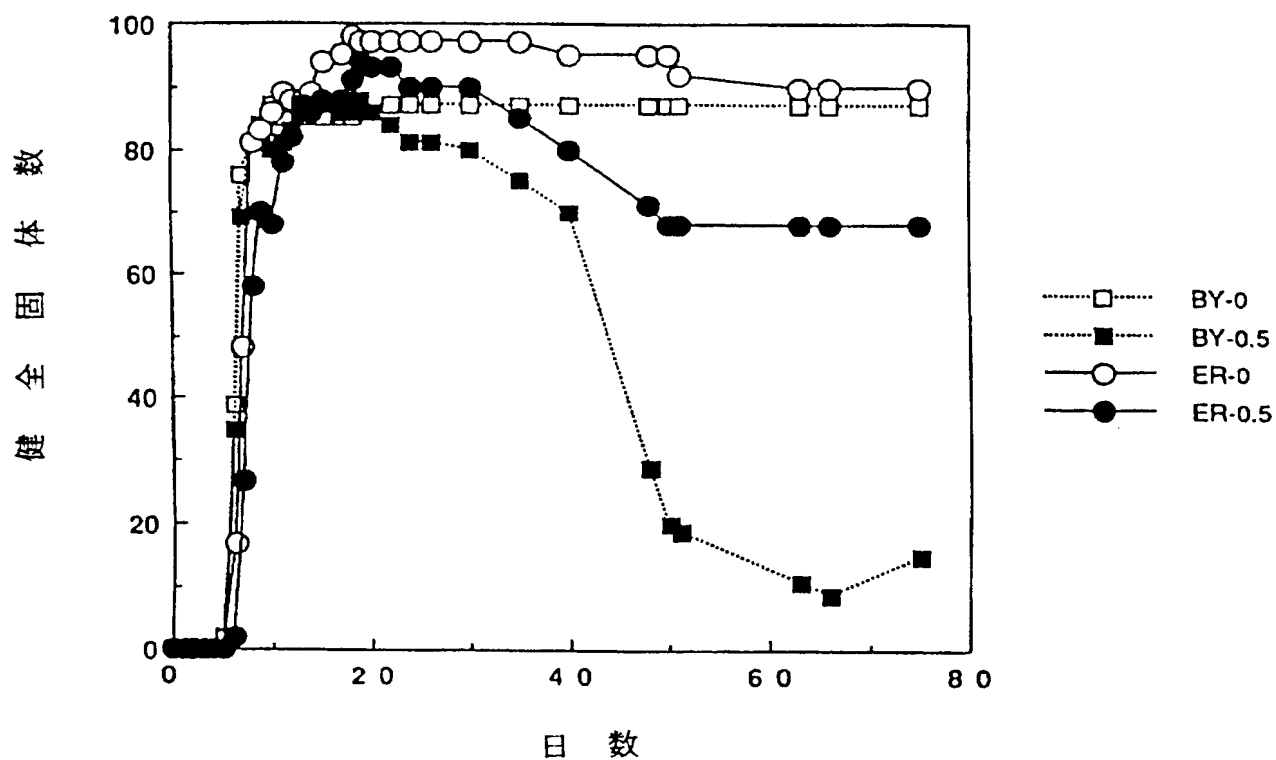
+タバコ腰折病菌

ER BY

-タバコ腰折病菌

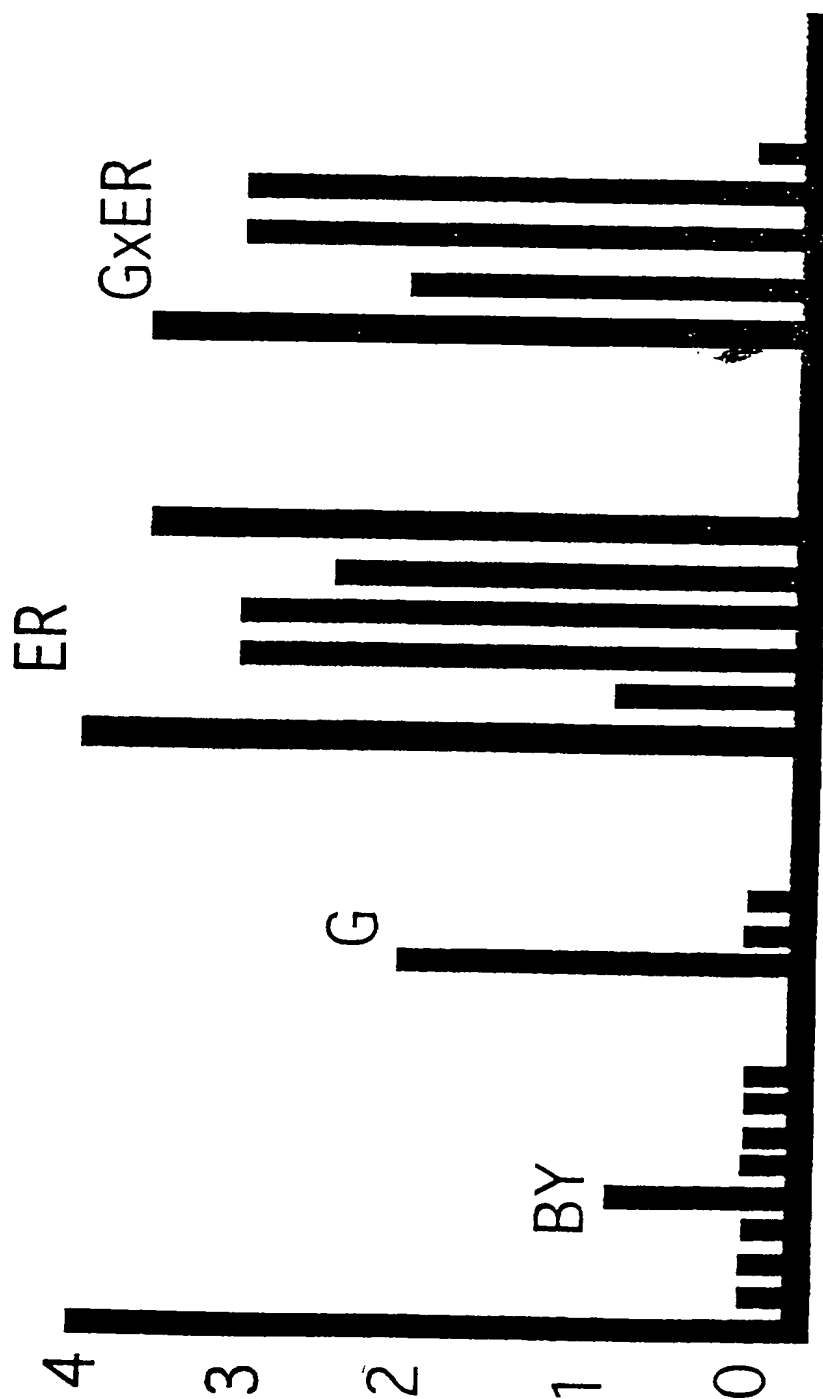
(播種63日目)

第 1 1 図



BY-0: コントロールタバコ
 BY-0.5: コントロールタバコ+タバコ腰折病菌
 ER-0: ER形質転換タバコ
 ER-0.5: ER形質転換タバコ+タバコ腰折病菌

第 1 2 図 タバコ疫病菌 (*P. nicotiana*) の遊走子に対する抵抗性



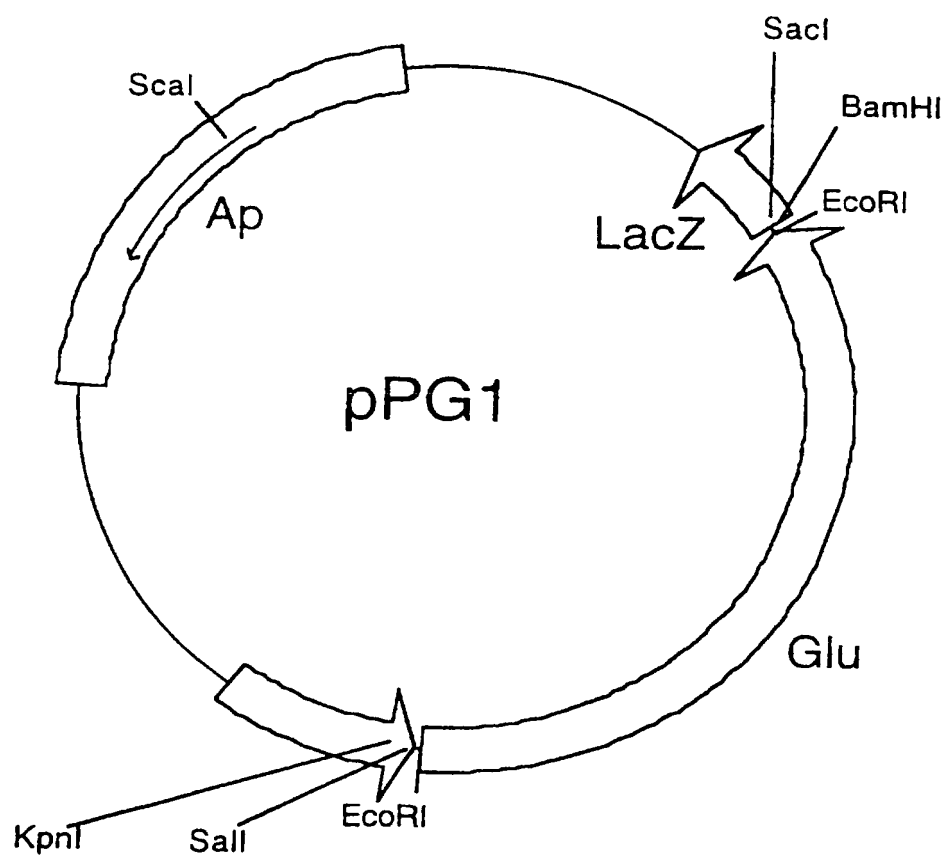
BY : 非形質転換タバコ

G : グルカナーゼ発現タバコ

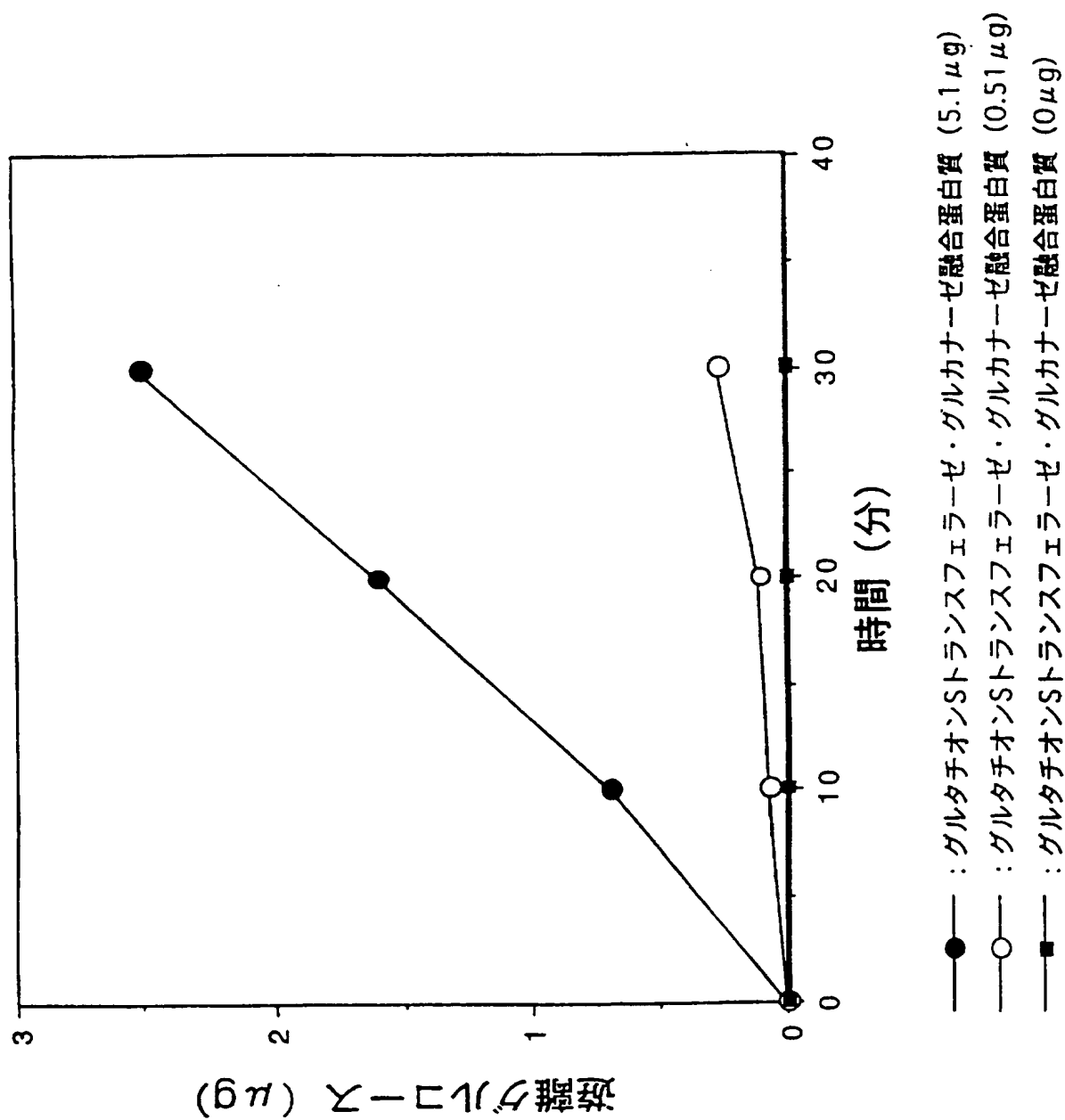
ER : ER発現タバコ

GxER : グルカナーゼ、ER共発現タバコ

第 1 3 図



第14図 インゲングルカナーゼ活性測定



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03653

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ A01H5/00, C12N15/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ A01H5/00, C12N15/29

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI/L (elicitor?*receptor?)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-321995, A (Kirin Brewery Co., Ltd.), November 22, 1994 (22. 11. 94) (Family: none)	1 - 27
A	Plant Physiology, Vol. 73, No. 2, (1983), M. Yoshikawa, et al. "A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation.", p. 497-506	1 - 27
A	European Journal of Biochemistry, Vol. 204, No. 3, (1992), E.G. Cosio, et al. "Identification of a high-affinity binding protein for a hpetal- β -glucoside phytoalexin elicitor in soybean.", p. 1115-1123	1 - 27
A	Plant and Cell Physiology, Vol. 34, No. 8, (1993), M. Yoshikawa and K. Sugimoto, "A specific binding site on soybean membranes for a phytoalexin elicitor released from fungal cell walls by β -1,3-endoglucanase." p. 1229-1237	1 - 27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 10, 1997 (10. 03. 97)

Date of mailing of the international search report

March 18, 1997 (18. 03. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A01H5/00, C12N15/29

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A01H5/00, C12N15/29

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI/L (elicitor?*receptor?)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 6-321995, A (麒麟麦酒株式会社), 22. 11月, 1994 (22. 11. 94) (ファミリーなし)	1-27
A	Plant Physiology, vol.73, no.2, (1983), M.Yoshikawa, et al. "A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation.", p.497-506	1-27
A	European Journal of Biochemistry, vol.204, no.3, (1992), E.G.Cosio, et al. "Identification of a high-affinity binding protein for a hepta-β-glucoside phytoalexin elicitor in soybean.", p.1115-1123	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.03.97

国際調査報告の発送日

18.03.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

郡山 順

印

2B

9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3237

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant and Cell Physiology, vol. 34, no. 8, (1993), M. Yoshikawa and K. Sugimoto. "A specific binding site on soybean membranes for a phytoalexin elicitor released from fungal cell walls by β -1,3-endoglucanase." p. 1229-1237	1-27

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)